



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA,
BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS**

**Recuperación morfológica y conductual
de ratas hemiparkinsonianas inducida por transferencia
del gen BDNF-flag a través del poliplex de neurotensina a
neuronas dopaminérgicas nigrales**

TESIS QUE PRESENTA

M en C. Nancy Georgina Hernández Chan

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de la Tesis:

Dr. Daniel Martínez Fong

México, D.F.

Enero

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. ANTECEDENTES.....	3
3.1. ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	3
3.1.2. ESTADÍSTICAS MUNDIALES Y NACIONALES DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	3
3.1.3. ETIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	4
3.1.4. FACTORES DE RIESGO.....	4
A) FACTOR GENÉTICO.....	5
B) EXPOSICIÓN A TOXINAS.....	6
C) INFLAMACIÓN.....	7
3.2 MODELOS EXPERIMENTALES DE ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	7
3.2.1. MPTP Y NEUROTOXINAS OXIDATIVAS.....	9
3.3. NEUROTROFINAS.....	10
3.4. FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DEL CEREBRO (BDNF).....	12
3.5. EL BDNF DURANTE EL DESARROLLO DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO NIGROESTRIATAL	13
3.6. ESTUDIOS EN ANIMALES TRANSGÉNICOS.....	14
3.7. EL BDNF COMO RESPUESTA FISIOLÓGICA AL DAÑO.....	16
3.8. EL BDNF COMO NEUROPROTECTOR.....	18
3.9. EL BDNF EN ENCÉFALOS HUMANOS CON ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	20
3.10. EL RECEPTOR DE NEUROTENSINA DE ALTA AFINIDAD.....	22

3.11. EL RECEPTOR DE NEUROTENSINA COMO VÍA PARA LA TRANSFERENCIA DE GENES	23
3.12. EL POLIPLEX DE NEUROTENSINA COMO HERRAMIENTA DE TRANSFERENCIA GÉNICA	24
4. HIPÓTESIS	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1. ANIMALES	25
5.2. CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA.....	26
5.3. SÍNTESIS DEL NT-PLX.....	27
5.4. PLÁSMIDOS.....	28
5.5. ANÁLISIS HISTOLÓGICO.....	29
5.6. CONTEO CELULAR	30
5.7. DOBLES INMUNOFUORESCENCIAS	30
5.8. EVALUACIÓN CONDUCTUAL.....	31
5.8.1. CONDUCTA MOTORA ESPONTÁNEA EN CAMPO ABIERTO.....	31
5.8.2. CONDUCTA DE GIRO.....	32
5.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
5.10. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC), CONTENIDO DE DOPAMINA	33
5.11. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPCIÓN REVERSA.....	34
6. RESULTADOS.....	35
6.1. LAS NEURONAS DOPAMINERGICAS NIGRALES CONSERVAN EL NTSR1	35
6.2. RECUPERACIÓN MORFOLÓGICA.....	40
6.2.1. LA ARBORIZACIÓN EN LA SUSTANCIA NIGRA TRANSFECTADA CON BDNF-FLAG.....	40

6.2.2. INERVACIÓN DOPAMINÉRGICA ESTRIATAL.....	41
6.3. RECUPERACIÓN DE LOS NIVELES DE DOPAMINA.....	42
6.4. RECUPERACIÓN CONDUCTUAL.....	44
6.4.1. CONDUCTA MOTORA ESPONTÁNEA EN CAMPO ABIERTO.....	44
6.4.2. CONDUCTA DE GIRO INDUCIDO POR ANFETAMINA.....	46
6.4.3. CONDUCTA DE GIRO INDUCIDO POR APOMORFINA.....	47
7. DISCUSIÓN.....	48
8. CONCLUSIONES.....	51
REFERENCIAS	52
TABLA DE ABREVIATURAS.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de acción de neurotoxinas en modelos de Parkinsonismo	9
Figura 2. Cascada de señalización BDNF- TrKB.....	11
Figura 3. Coordinada de lesión con 6-OHDA.....	27
Figura 4. Expresión de la proteína y RNAm de NTSR1.....	37
Figura 5. Expresión de la proteína y RNAm de BDNF-flag.....	38
Figura 6. Expresión de la proteína y RNAm de GFP.....	39
Figura 7. Diferencias morfológicas en la invasión de la SNc.....	43
Figura 8. Diferencias morfológicas en el núcleo estriado.....	42
Figura 9. Niveles de dopamina medido por HPLC.....	44
Figura 10. Conducta Motora Espontánea.....	45
Figura 11. Conducta de giro inducida por fármacos.....	47

1. RESUMEN

El poliplex de Neurotensina (PLX- NT) es un sistema de nanopartículas capaz de transferir genes a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (SN) por su internalización a través del receptor de neurotensina tipo 1 (NTSR1).

En la enfermedad de Parkinson (EP) la pérdida de la influencia neurotrófica de BDNF, un factor trófico expresado por las neuronas dopaminérgicas, ocurre concomitante a la neurodegeneración nigral.

En este trabajo, se propone que la sobreexpresión de BDNF por las neuronas sobrevivientes en las etapas tempranas de la EP, podría promover la supervivencia y restauración de un sistema dopaminérgico ya comprometido.

Una semana posterior a la lesión con la neurotoxina 6-OHDA, se transfectó el gen BDNF-flag utilizando el PLX- NT a la SN de ratas hemiparkinsonianas; dos semanas después de la transfección se evaluó a los animales transfectados y sus controles en parámetros conductuales, neuroquímicos y morfológicos.

Nuestros resultados muestran que una semana posterior al reto neurotóxico, las neuronas dopaminérgicas remanentes conservan la expresión de NTSR1 y con ello, la capacidad de ser transfectadas por el PLX-NT.

De este modo, dos semanas después de la transfección nigral se observó expresión de la proteína BDNF-flag concomitante a una robusta arborización de las fibras dopaminérgicas en la SN previamente dañadas. Paralelo a la restauración la inervación dopaminérgica nigral y estriatal, los niveles de dopamina se restablecieron en un 70% en este último núcleo dos semanas después de la transfección. Asociado a los cambios morfológicos y neuroquímicos, los animales hemiparkinsonianos mostraron una mejoría en las alteraciones motoras. De este modo, se propone que la terapia neurotrófica con BDNF podría ser útil como alternativa terapéutica en las etapas tempranas de la EP.

2. ABSTRACT

The NTS-polyplex is a nanoparticle system able to transfer genes by its internalization into nigral dopamine neurons via the neurotensin-receptor type 1 (NTSR1). In Parkinson's disease (PD), the loss of the neurotrophic influence of BDNF, a neurotrophin expressed by dopamine neurons, occurs along with dopamine neurodegeneration. We hypothesized that the BDNF overexpression in surviving dopamine neurons in the early stage of parkinsonism can provide restoration of a damaged dopaminergic system. In this experimental approach, BDNF gene was transfected using NTS-polyplex to dopaminergic neurons of hemiparkinsonian rats induced by 6-hydroxydopamine. Our results showed that the residual dopamine neurons retain the expression of the NTSR1 and thus, the capability to be transfected by the NTS-polyplex. The BDNF expression caused a robust sprouting of dopamine fibers in the substantia nigra and restoration of both innervation and dopamine levels in the striatum two weeks after transfection. A partial improvement of motor deficits also occurred. The BDNF neurotrophic therapy might be a useful therapeutic strategy in the treatment of early stages of PD.

3. ANTECEDENTES

3.1. ENFERMEDAD DE PARKINSON

3.1.2. Estadísticas Mundiales y Nacionales

Después de la demencia tipo Alzheimer, la enfermedad de Parkinson (EP) es el segundo trastorno neurodegenerativo con mayor incidencia mundial. Se estima que alrededor del 2% de la población mayor de 60 años padece EP (Schapira AH, 2008). Hacia el año 1997, México tenía aproximadamente 500,000 pacientes con la enfermedad (Alarcón- Aguilar A, 2010); sin embargo existe poca información estadística reciente respecto a la proporción de pacientes con EP que existen en la República Mexicana. Algunos estudios aislados, como el realizado en población abierta del estado de Jalisco en 2002 se encontró que la prevalencia de EP era de 2.7 por cada 1000 habitantes, predominantemente mayores de 60 años (Cruz- Alcalá, 2002). Datos de instituciones de salud como el *Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud* (CENETEC) y la *Secretaría de Salud*, estimaron que en 2010 había en México alrededor de 40 a 50 casos por cada 10,000 habitantes por año. Considerando que la población mexicana en 2014 fue de aproximadamente 120 millones de habitantes según el *Instituto Nacional de Estadística y Geografía*, entonces se estima que podría haber 60,000 pacientes con EP en el territorio nacional. Aunque existen otras fuentes como la *Asociación Mexicana de Parkinson* (en Alarcón- Aguilar A, 2010), que refieren que podría haber cifras superiores (hasta 2 millones de pacientes con EP actualmente en nuestro país, la realidad es que existen la necesidad de generar información estadística recientes respecto a la incidencia y prevalencia de la EP en México, a fin de vislumbrar con claridad la magnitud de este trastorno a nivel nacional.

Debido a que la expectativa de vida se ha incrementado en los últimos años, se estima que a nivel mundial, la cifra de enfermedades neurodegenerativas se incremente un 120 a 230% en las próximas décadas, proyectando que, hacia el año 2030 habrá alrededor de 9 millones de personas con EP en Europa y en los países más poblados a nivel mundial (Otero-Silicio E, 1996 en Góngora-Alfaro JL, 2005; Dorsey ER, 2007).

Dado que la EP es una enfermedad incapacitante que compromete la calidad de vida del paciente e impacta socio-económicamente a la familia involucrada, y que se estima que en 2050 la población de adultos mayores en

México alcanzará a ser el 28% de la población, según cifras del ENSANUT (2012), resulta importante el desarrollo de alternativas terapéuticas enfocadas a la limitación del daño o idealmente, la generación de estrategias regenerativas orientadas al restablecimiento de las funciones afectadas.

3.1.3. Etiología de la Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez como “Parálisis Agitante” por el neurólogo James Parkinson; esta patología se caracteriza por síntomas como temblor en reposo, rigidez, propensión al flexionamiento de tronco, dificultad en la marcha y alteraciones cognitivas (Bartels AL, 2009).

La disminución en los niveles del neurotransmisor dopamina ocasionada por la degeneración y muerte de la población de neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra *pars compacta* (SNc) en el mesencéfalo ventral, es la causa principal de los síntomas motores característicos de la enfermedad. Las alteraciones motoras resultan de la depleción de la dopamina de origen nigro-estriatal (Schapira AH, 2008; Lotharius J, 2002).

La falta de dopamina y las consecuentes alteraciones motoras ocasionadas por su pérdida, constituyen el “sello” característico de la enfermedad de Parkinson; sin embargo otros grupos neuronales en el tallo cerebral como núcleos colinérgicos, serotoninérgicos y adrenérgicos, son también afectados por la neurodegeneración, ocasionando síntomas adicionales como anosmia, trastornos de sueño, alteraciones autonómicas, ansiedad y demencia, que en conjunto inciden de manera negativa en la calidad de vida del paciente con la enfermedad (Emre M, 2003; Reichmann H, 2009).

3.1. 4. Factores de Riesgo

Aunque la Enfermedad de Parkinson es una patología catalogada como “idiopática”, existen al menos tres factores, además del envejecimiento, que se han asociado al desarrollo de la EP a saber: 1) el factor genético, 2) la exposición a toxinas, 3) los procesos inflamatorios.

A) Factor genético

Existen varios genes relacionados con el desarrollo de la patología entre los que destacan PARK1, PARK2 y PINK1, los cuales se encuentran mutados en poblaciones que presentan parkinsonismo de inicio juvenil (Schapira AH, 2008). Los dos primeros genes están involucrados en la función mitocondrial, su supresión en modelos experimentales de la enfermedad lleva a la muerte de las neuronas dopaminérgicas por apoptosis, situación similar a la que ocurre en la SNc durante el envejecimiento (Beal MF, 1995; Biskup S, 2006; Surmeier DJ, 2011).

Por otra parte, las mutaciones en el gen LRRK2 (que codifica para la cinasa 2 rica en leucina repetida), están involucradas con alteraciones en la fosforilación que se relaciona con el parkinsonismo familiar (Schapira AH, 2008). LRRK2 constituye también uno de los agentes involucrados en la formación de agregados anormales de proteínas formados al interior del citoplasma de diversas poblaciones de neuronas, incluyendo las dopaminérgicas nigrales. Esta disfunción particular en la disposición de proteínas, está presente en la EP y otras patologías como la neuronas (Liu G, 2012) atrofia sistémica múltiple, la demencia con cuerpos de Lewy y la demencia tipo Alzheimer, patologías en donde contribuye a la neurodegeneración. Otras proteínas que conforman los cuerpos de Lewy y que se han relacionado con el desarrollo de EP son, la ubiquitina y la α -sinucleína. La ubiquitina, es un polipéptido que participa en el proceso normal de degradación de proteínas celulares hacia el proteosoma. La ubiquitina es activada por la enzima activadora de ubiquitina E1 y acarreada hacia las proteínas sustrato por E2, para finalmente ser ligada por E3. La proteína *Parkina* codificada por el gen *parkin* que sufre mutaciones en familiares con parkinsonismo de inicio temprano (<40 años), tiene acción como ligasa E3 y por tanto está involucrada en el adecuado direccionamiento de proteínas hacia la degradación en el proteosoma; por lo que errores en el funcionamiento de parkina podrían ocasionar agregados intracitoplásmicos de proteínas, tal como sucede en la formación de cuerpos de Lewy en las neuronas nigrales (Giasson BI, 2003).

La proteína α -sinucleína por otra parte, es una proteína monomérica involucrada en la formación de las vesículas sinápticas y la liberación de neurotransmisor (Liu G, 2012). En condiciones patológicas α -sinucleína sufre

un cambio conformacional que posibilita la formación de polímeros fibrilares, por lo que se asocia el exceso de α -sinucleína anómala a defectos en el tráfico intracelular, neurotransmisión y formación de cuerpos de Lewy en las neuronas dopaminérgicas nigrales (Giasson GI, 2003).

B) Exposición a toxinas

El segundo factor asociado al desarrollo de EP es la exposición a toxinas y el daño por estrés oxidante (Schapira AH, 2008; Bartels AL, 2009). Se ha documentado que la exposición a herbicidas como el maneb y el paraquat, o insecticidas como la rotenona, que producen daño a la cadena oxidativa mitocondrial, incrementan el riesgo de desarrollar EP (Brighina L, 2008; Brown TP, 2006; Bové J, 2012).

Por otra parte, se postula que la regulación del calcio intracelular podría también desempeñar un papel nocivo para las neuronas dopaminérgicas, ya que las constantes oscilaciones debidas a la actividad marcapaso mediada por canales de calcio L Cav-1.3, sumada a la actividad normal por despolarización, imprimen a la neurona dopaminérgica un riguroso control del nivel de calcio intracelular, y a la vez que constituye un riesgo potencial de daño mitocondrial por desregulación del mismo, lo que conllevaría a la degeneración y muerte de la población dopaminérgica (Surmeier DJ, 2007; Sgobio C, 2014).

Existen que sugieren la capacidad del canal L Cav-1.3 para sostener la actividad marcapaso de las neuronas nigrales, se incrementa con la edad, ya que las neuronas dopaminérgicas juveniles (no afectadas por EP) aparentemente utilizan mecanismos alternos para el mantenimiento de tal actividad oscilatoria. Además se ha documentado que el bloqueo de los canales L Cav-1.3, protege a las neuronas dopaminérgicas de la degeneración en modelos de EP *in vitro* e *in vivo* (Chan CS, 2007; Chan CS, 2009).

Otro factor tóxico que pone en riesgo a las neuronas dopaminérgicas es el estrés oxidante; esto se debe a sus características bioquímicas, las catecolaminas como la dopamina pueden convertirse en quinonas por oxidación. Fisiológicamente, las catecolaminas son susceptibles de oxidarse por productos de la peroxidación de lípidos originando tetrahydroquinolinas tóxicas para la célula (Napolitano A, 2011). Incluso, se ha postulado al óxido nítrico y al hierro como posibles mediadores del daño oxidativo ocasionado a

las neuronas dopaminérgicas en la EP (Jenner P, 1998; Jenner P, 2003; Youdim MB, 2004).

C) Inflamación

El tercer factor asociado a la degeneración dopaminérgica que ocurre en la EP es la respuesta inflamatoria mediada por células a cargo de la respuesta inmune del SNC, como los astrocitos y la microglía que, ante la presencia de factores potenciales de daño celular son activadas en aras del restablecimiento de la homeostasis del tejido. Si bien los astrocitos y la microglía en acción conjunta con macrófagos contribuyen en condiciones de daño tisular a la remoción de restos celulares, e incluso a la liberación de algunos factores tróficos como BDNF y GDNF (Batchelor PE, 2002), la desregulación de la respuesta inmunopodría tornarse letal, debido a la liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), citocinas pro-inflamatorias (Phani S, 2012), TNF- α e interleucinas (Long-Smith CM, 2009).

Existen también reportes que documentan la participación de células del sistema inmune periférico como los linfocitos T, CD4 y CD8, que se han localizado infiltrados en la SNc de pacientes con EP, así como en modelos murinos de la enfermedad que han sido sometidos a la neurotoxina MPTP (Phani S, 2012; Gruden MA, 2011). Los hallazgos antes mencionados apuntan a que los mecanismos inmunológicos centrales y periféricos podrían contribuir con la progresión de la EP.

3.2. Modelos Animales de Enfermedad de Parkinson

Aunque la enfermedad de Parkinson es una patología que afecta de manera exclusiva a los humanos, la implementación de modelos animales de la enfermedad ha permitido estudiar los posibles mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de la misma, con miras al diseño de estrategias preventivas o terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad.

De esta manera, se han utilizados protocolos de lesión mecánica así como modelos de daño celular inducido por neurotoxinas para promover la degeneración de las neuronas dopaminérgicas (Venero JL, 2000). Estos últimos modelos han gozado de gran popularidad en las últimas décadas debido a que emulan algunas de las alteraciones que ocurren en los pacientes con EP. Así, las dos neurotoxinas de uso más común en modelos animales de

parkinsonismo son: el 1-metil- 4- fenil, 1,2,5,6- tetrahidropiridina (MPTP) y la 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA)(Figura 1).

Por otra parte, se han generado recientemente algunos modelos animales que guardan semejanza con algunos aspectos relevantes de la EP, tales como la dismunición gradual de la motricidad, la deficiencia en la transmisión dopaminérgica y la respuesta al tratamiento con levodopa (Xu Q, 2012). De este modo, en modelos murinos transgénicos como los ratones hLRRK2 (R1441G) creados mediante la utilización de la proteína humana LRRK2 y un cromosoma artificial bacteriano (BAC), se ha estudiado la degeneración axonal que ocurre en etapas iniciales del deterioro del sistema nigroestriatal en modelos genéticos de la EP (Tagliaferro P, 2015). Asimismo, se ha evaluado en estos animales, el efecto terapéutico positivo sobre el funcionamiento mitocondrial, de un derivado de la apocinina, un inhibidor fenólico selectivo de la inmunidad innata y la respuesta inflamatoria (Dranka BP, 2014).

Otros animales se han modificado genéticamente, teniendo a α -sinucleína como blanco. Así, se ha observado en una línea de ratones transgénicos con sobre-expresión de la proteína α -sinucleína A53T selectiva a neuronas dopaminérgicas, que estos animales muestran profundas alteraciones mitocondriales de aparición temprana, mismas que se agudizan ante la delección de los genes PINK1 o *parkin* (Chen L, 2015). Se ha explorado adicionalmente, el efecto de la mutación (extremo C-terminal truncado) del gen *parkin* en ratones (Parkin-Q311X), encontrando que en etapas tardías del desarrollo, los animales desarrollaban una disminución progresiva de la motricidad, así como agregación de proteínas y estrés oxidativo (Lu XH, 2009). De este modo, los modelos transgénicos de la EP han permitido elucidar algunas alteraciones moleculares subyacentes a los síntomas motores que se presentan en la EP.

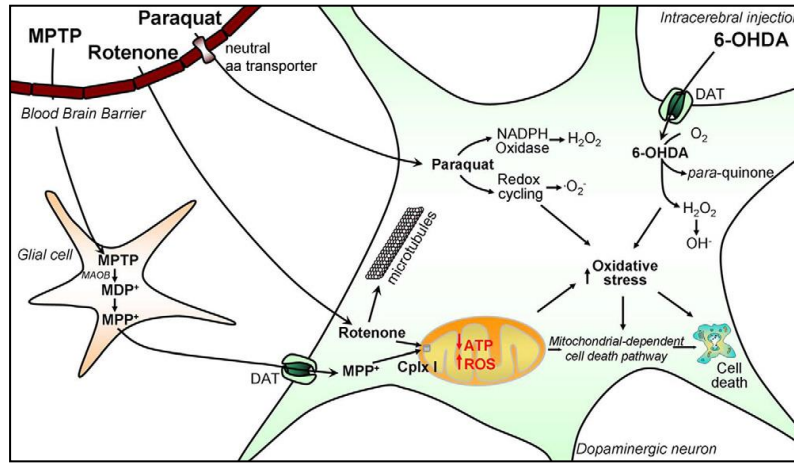


Figura 1. Mecanismos de acción de las neurotoxinas utilizadas en los modelos experimentales de la enfermedad de Parkinson. A) 6-Hidroxidopamina (análogo sintético de la dopamina) entra a las neuronas dopaminérgicas a través de transportador de dopamina (DAT) y genera peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y quinonas, que generan estrés oxidativo y daño mitocondrial a través de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). B) MPTP es un compuesto lipofílico capaz de atravesar la barrera hematoencefálica para ser captado por los astrocitos y metabolizado a MPP⁺ por la enzima MAOB; el MPP⁺ es captado por las neuronas a través de DAT, causando inhibición del complejo mitocondrial I y muerte celular. C) la Rotenona y el Paraquat son también compuestos lipofílicos que generan ROS y la inducción de muerte celular (Tomado de Bové J, 2012).

3.2.1. MPTP y Neurotoxinas Oxidativas

A finales de la década de los 70's surgieron algunos reportes de pacientes jóvenes con síntomas de parkinsonismo asociado al consumo de meperidina, un potente analgésico opiáceo y análogo sintético de la *heroína* (Davis GC, 1979; Langston JW, 1983). El MPTP (1-metil- 4- fenil, 1,2,5,6-tetrahidropiridina) es el producto intermedio del MPP (1-metil-4 fenil-propionoxipiperidina), un análogo de la meperidina. Debido a su naturaleza lipofílica el MPP es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y llegar a los astrocitos, donde es metabolizado a MPP⁺ por la enzima MAO-B (Blesa J, 2012). El metabolito MPP⁺ es capturado por el transportador de dopamina (DAT), e introducido al citosol de la neurona dopaminérgica. En el interior de la neurona el MPP⁺ inhibe al complejo I mitocondrial causando estrés oxidativo, que consecuentemente lleva a la degeneración y muerte de tal población neuronal. La administración de MPTP es considerado el modelo de parkinsonismo que más se asemeja a la EP, y es por ende el más utilizado en especies susceptibles como algunos primates, gatos y ratones.

En otros modelos murinos como la rata albina, el neurotóxico de uso más común es la 6-OHDA. Tras su descubrimiento en la década de los 70's, la utilización de la neurotoxina 6-OHDA en el sistema nigroestriatal ha constituido uno de los modelos de lesión selectiva para neuronas dopaminérgicas más populares, ya que mimetiza en algunos aspectos la sintomatología de la enfermedad de Parkinson (Ungerstedt U, 1968).

Debido a su alta semejanza estructural con las catecolaminas, la 6-OHDA es capaz de ser captado por el DAT hacia el interior de la neurona dopaminérgica. En el interior del citoplasma, la 6-OHDA genera por auto-oxidación especies reactivas de oxígeno (ROS), como quinonas y peróxido de hidrogeno. Este último mediante la reacción de Fenton con el hierro altamente concentrado en las neuronas nigrales, es convertido en radical OH que causa estrés oxidativo y la consecuente muerte de la población dopaminérgica (Kell DB, 2010).

Aunque existen varios abordajes experimentales de aplicación de la neurotoxina 6-OHDA en diferentes puntos de la vía dopaminérgica nigroestriatal, (Schwartzing RK, 1996) se ha preferido la administración estriatal unilateral de la toxina, como modelo de inducción de hemiparkinsonismo ya que induce de manera retrógrada y gradual la pérdida de los somas catecolaminérgicos nigrales, mimetizando así la degeneración progresiva que ocurre en el parkinsonismo humano. Esta metodología, se describe posteriormente, ya que es la utilizada en este trabajo (González Barrios JA, 2006).

3.3. Neurotrofinas

Las neurotrofinas son una familia de proteínas relacionadas entre sí, cuya distribución en el sistema nervioso central (SNC) es amplia. A esta familia pertenecen el factor de crecimiento neural (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), y las neurotrofinas (NT's) 3, 4/5, 6 y 7. A excepción de NT-6 y NT-7, que se encuentran únicamente en peces, las demás neurotrofinas derivan del mismo gen ancestral encontrando filogenéticamente en cordados (Huang EJ, 2001).

Las neurotrofinas se sintetizan en forma de pro-neurotrofinas de peso molecular aproximado de 30 kD y, mediante la acción de enzimas convertidas de pro-hormonas como la furina, son cortadas a su forma madura de aproximadamente 14 kD. Las neurotrofinas maduras forman principalmente

homodímeros y ejercen su acción a través de la unión con receptores transmembranales tipo tirosin (tropomiosina) cinasa (TrK) localizados en las células blanco. Así, TrKA es el receptor de alta afinidad para NGF, TrKB para BDNF y NT-4/5, y TrKC para NT-3, respectivamente (Numan S, 2005; Murer MG, 2001).

La unión con los ligandos, induce la dimerización de sus receptores TrK y la consecuente autofosforilación en sus dominios tirosin cinasa, creando sitios de anclaje para proteínas intracelulares. La activación de de los receptores TrK desencadena cascadas de señalización como la de fosfolipasa C (PLC- γ 1), Ras- MAPK (Cinasa activada por mitógeno), CREB (Elemento de respuesta a la unión de AMPc) y PI3K (Cinasa activada por Fosfatidil inositol-3) (Binder DK, 2007). Entre las acciones inducidas por la unión de las NT's a sus receptores destacan la proliferación, supervivencia y diferenciación celular, así como el crecimiento axonal, remodelación dendrítica, la formación sináptica, y la expresión proteínas cruciales para el funcionamiento neural normal (Huang EJ, 2001)(Figura 2).

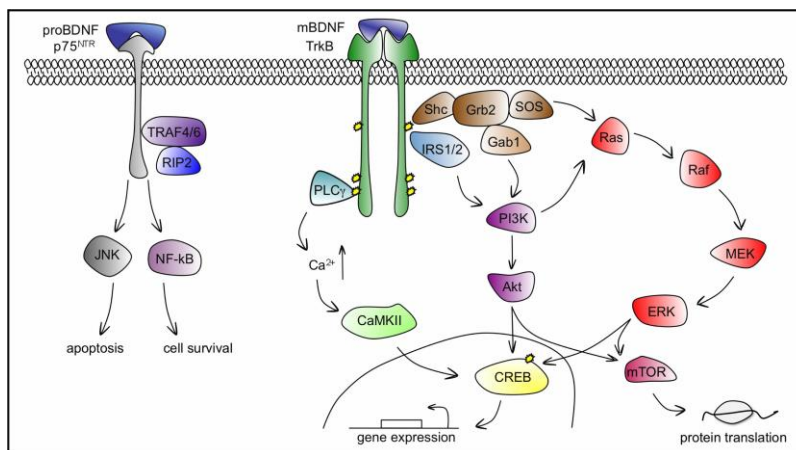


Figura 2. Cascadas de señalización BDNF- TrkB. El BDNF se une a su receptor de alta afinidad TrkB formando dímeros e induciendo la autofosforilación, que recluta sitios de anclaje para proteínas efectoras que desencadenan cascadas de señalización como PLC γ , PI3K y ERK, que llevan a la activación del factor de transcripción CREB. El cambio en la expresión génica culmina con acciones diversas como la promoción de la supervivencia, diferenciación y proliferación celular (Tomado de Cunha C, 2010).

Además de unirse a sus receptores específicos, las NT's también poseen capacidad de unión al receptor de baja afinidad para neurotrofinas p75NTR, miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), cuya activación desencadena cascadas de señalización relacionadas con la inducción de apoptosis (Binder DK, 2007).

3.4. Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF)

El BDNF fue descrito por primera vez en homogeneizados de cerebro porcino en la década de los 80's, 30 años después de la identificación del NGF como factor trófico en embriones de pollo (Bennet NR, 2002).

De manera similar a las otras neurotrofinas, el BDNF se sintetiza como el precursor inmaduro pro-BDNF de 32 kD y es cortado por acción enzimática a su forma madura de 14 kD en la red trans-Golgi. Tanto la forma madura como su precursor inmaduro BDNF, son incluidos en vesículas de secreción y liberados al espacio extracelular y similar a otras neurotrofinas, BDNF forma dímeros para ejercer su acción celular (Mowla SJ, 2001).

En los primeros estudios hechos por Barde, el BDNF probó su eficiencia en la inducción de sobrevivencia de cultivos de neuronas espinales sensoriales de embriones de pollo (Barde YA, 1982). A partir de ello el BDNF, se ha relacionado con inducción a la supervivencia de diversas poblaciones neuronales como las células ganglionares de la retina (Johnson JE, 1986), neuronas corticales (Ghosh A, 1994), hipocámpales (Lowenstein DH, 1996), colinérgicas (Ward NL, 2000) y dopaminérgicas (Hyman C, 1991; Baquet ZC, 2005).

El BDNF y su receptor TrkB se encuentran ampliamente distribuidos en el SNc en áreas tales como el hipocampo, la amígdala, el prosencéfalo basal, la corteza, el tallo, el cerebelo y el mesencéfalo de mamíferos adultos (Murer MG, 2001). Asimismo, se ha encontrado expresión de los RNAm tanto de BDNF como de TrkB en las neuronas positivas a tirosina hidroxilasa (TH) de la sustancia nigra pars compacta (SNc) y área ventral tegmental (VTA) (Seroogy KB, 1994; Numan S, 1999) de encéfalos murinos adultos.

Se postula que el BDNF expresado en las neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo del adulto desempeñan un importante papel en el mantenimiento de tal población neuronal, aunque también se ha establecido que ejecuta una importante función durante la embriogénesis, ya que está asociado a la supervivencia y diferenciación de las neuronas dopaminérgicas en ciernes durante la etapa prenatal.

3.5. El BDNF durante el desarrollo del Sistema Dopaminérgico Nigroestriatal

Durante el desarrollo embrionario de la rata, el periodo crítico en la determinación del número definitivo de neuronas dopaminérgicas que permanecerán en la adultez, oscila entre los días embrionarios 14 a 16 (E14-16). Es en este contexto que, estudios hechos en cultivo celular, han encontrado que la administración sostenida y temprana de BDNF incrementa significativamente el número de neuronas que expresan TH, la enzima limitante de la síntesis de dopamina, con respecto a los cultivos sin tratamiento (Hyman C, 1991). Más aún, la administración de BDNF a los cultivos dopaminérgicos posteriores al periodo crítico, previene de la pérdida de las neuronas TH positivas. Asimismo, la administración de BDNF recombinante en este periodo de tiempo induce la recaptura de dopamina en estas neuronas (Knüsel B, 1991). Estos hallazgos sugieren que BDNF participa en la promoción del fenotipo dopaminérgico morfológico y funcional, así como en la inducción de la sobrevivencia de las neuronas que expresan TH en el mesencéfalo.

Aunque el nivel de BDNF es bajo en la SNc al nacimiento, este se incrementa durante los días postnatales 14-16 (P14-16) siguiendo el desarrollo postnatal temprano en la rata. Después de este periodo, el nivel de BDNF nigral disminuye hasta incrementarse nuevamente en el desarrollo postnatal temprano en la rata y después disminuye en la adultez (Zhou J, 1996; Numan S, 2005; Seroogy KB, 1994). Otros experimentos hechos en cultivo celular de neuronas del mesencéfalo ventral de rata neonata (P5-6) han demostrado que el BDNF desempeña un papel importante en la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas en el desarrollo postnatal temprano.

Utilizando protocolos *in vitro*, se ha neutralizado la acción del BDNF mediante anticuerpos o antagonistas competitivos mostrando que la eliminación de su acción induce apoptosis y reducción en el número de neuronas que expresan TH. En contraste, si la neutralización del BDNF ocurre tardíamente hacia el día posnatal 14 ó 20, no ocurre apoptosis ni reducción celular dopaminérgica (Oo TF, 2009). Lo cual sugiere que las neuronas dopaminérgicas nigrales son más sensibles a la acción de BDNF para su determinación numérica y fenotípica, durante el desarrollo postnatal temprano comparado con la etapa posnatal tardía.

En condiciones donde se cultivan paralelamente neuronas del mesencéfalo ventral de ratas en edad posnatal temprana y tejido estriatal, la administración de BDNF incrementa el número de neuronas TH⁺ en el cultivo, así como el crecimiento de fibras TH⁺ hacia el tejido. Este hallazgo refuerza la idea de que el BDNF es un inductor del fenotipo dopaminérgico, ya que el número total de neuronas en cultivo permanece constante, y abre la posibilidad de que esta neurotrofina pudiera funcionar como facilitador de la inervación estriatal en el desarrollo postnatal (Ostergaard K, 1996).

Contrario a la disminución en los niveles nigrales de BDNF asociada al desarrollo, la disminución en la expresión de su receptor TrKB, no ocurre en el desarrollo postnatal temprano ni en la edad adulta en la población de neuronas TH⁺ del mesencéfalo (Numan S, 2005). Esta evidencia sugiere que aun cuando el nivel de BDNF disminuye desde la edad embrionaria hasta la edad adulta, las neuronas dopaminérgicas conservan su capacidad de responder a este, debido a que en condiciones fisiológicas continúan expresando el receptor TrKB a lo largo de la vida.

3.6. Estudios en Animales Transgénicos

Otros estudios han arrojado luz sobre la acción biológica del BDNF en el sistema nigroestriatal, principalmente aquellos estudios hechos en animales *knock out* homocigóticos (-/-), heterocigóticos (-/+) o animales que han sido modificados mediante técnicas de recombinación genética como el sistema Cre-LoxP, que genera animales con mutaciones en tejidos específicos (Kos H, 2004; Baquet ZC, 2005; Gavériaux-Ruff, 2007) .

Resulta complicada la generación de animales *knock out* completos para el gen BDNF (-/-) ya que la mutación es incompatible con la vida; sin embargo, existen algunos estudios hechos en animales *knock out* selectivos para sistema nervioso. De esta manera, se ha reportado que (Baker SA, 2005), el efecto de la delección del gen BDNF(-/-) o la reducción del 50% de BDNF(+/-) sobre la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas del sistema nigroestriatal. Ninguno de los dos grupos mostraron alteraciones morfológicas, ni cuantitativas entre el día posnatal 14 y los 18 meses de edad; pese a esto, los animales BDNF (-/-) tuvieron un menor número de procesos dendríticos durante el desarrollo posnatal temprano, lo cual sugiere que BDNF está

incorporado con la maduración y no con la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas nigrales.

Otros estudios hechos en animales transgénicos condicionales BDNF^{fl/fl}: Nestina-CRE, donde se logró eliminar la expresión de BDNF en el cerebro, la supresión no afectó el número total de neuronas TH⁺ al día P7 o en la adultez. Pese a esto, la falta de expresión de BDNF ocasionó evidentes alteraciones morfológicas, reflejadas por la presencia de “islas” de neuronas TH⁺ en vez de núcleos morfológicamente bien definidos y escasa delimitación de los bordes de la SNc en el individuo adulto (Oo TF, 2009).

En otro estudio con mutantes condicionales para BDNF, la evaluación morfológica hecha en ratones Wnt- BDNFKO donde la falta de expresión de BDNF abarcaba longitudinalmente las regiones del mesencéfalo al rombencéfalo (Baquet ZC, 2005), mostró que en estos animales ocurre una reducción del 23% en el número de neuronas TH⁺ al día postnatal 21 y hasta el día postnatal 120, aunque el número total de neuronas en la SNc permaneció inalterado. A la par de la reducción de neuronas TH⁺, los animales presentaron un pobre desempeño en pruebas motoras como el *rotarod*, así como dificultad motora en las patas traseras. De este modo, pareciera que la falta de expresión de BDNF es determinante en la inducción del fenotipo dopaminérgico, así como para el funcionamiento motor correcto, más que para el establecimiento del número total de neuronas dopaminérgicas en la SNc en la etapa postnatal tardía.

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos en animales BDNF (-/+), y mutantes condicionales, se sugiere que el BDNF es un factor determinante para el correcto establecimiento de la población dopaminérgica adulta, así como un funcionamiento motor normal. Es posible que la expresión parcial de BDNF pudiera ser suficiente para evadir las alteraciones morfo-funcionales en el animal adulto, o bien que existan otros mecanismos, quizá de naturaleza trófica, que compensen la falta de expresión completa de BDNF en el mesencéfalo en desarrollo.

Contrario a lo ocurrido en animales que no expresan BDNF, estudios en donde se sobreexpresa esta neurotrofina en el sistema nigroestriatal, como en los ratones transgénicos DBH: BDNF (Alonso- Vanegas MA, 1999), el número total de neuronas dopaminérgicas nigrales registrado en animales a las 10 semanas postnatales, mostró un incremento del 50% respecto sus controles.

Este hallazgo apoya la noción de que el BDNF pudiera actuar como un potente inductor del fenotipo TH positivo en las neuronas susceptibles de mesencéfalo ventral.

Si bien existen suficientes evidencias que apoyan el papel del BDNF en el desarrollo pre y postnatal de la población dopaminérgica nigral, para fines terapéuticos resulta relevante entender los mecanismos de acción de BDNF sobre esta población celular vulnerable en el encéfalo adulto. En uno estudio realizado en animales adultos donde se bloqueó la síntesis de BDNF nigral mediante la infusión de un oligonucleótido antisentido por 28 días, se encontró que el número total de neuronas TH⁺ disminuyó en un 40%. Concomitantemente a la reducción de la población dopaminérgica, los animales presentaron conducta de giro contralateral al administrar apomorfina sistémica (Porrit MJ, 2005). Este resultado hace pensar que BDNF desempeña un papel importante en el mantenimiento de la población de neuronas dopaminérgicas nigrales en la adultez.

3.7. El BDNF como Respuesta Fisiológica al Daño

Otros experimentos que sugieren la función de mantenimiento celular que tiene el BDNF sobre el sistema nigroestriatal, son aquellos en donde se lesiona este sistema en animales adultos por acción mecánica o mediante la administración de diversas toxinas. En protocolos de transección del haz prosencefálico medial (MFB), el principal tracto de fibras dopaminérgicas que inervan el núcleo estriado, se ha documentado que los niveles de RNAm de BDNF, se incrementan de manera transitoria en la SNc 24 horas posteriores a la axotomía; sin embargo, no se registraron cambios en el RNAm de TrkB en la SNc, entre los días 1 y 14 posteriores a lesión. Contrariamente, el RNAm de TrkB aumentó significativamente en el núcleo estriado sólo hasta las dos semanas después de ocurrida la lesión, tiempo en que el daño se ha limitado. Otro hallazgo importante, es que ambos RNAm (BDNF y TrkB) se incrementaron en el sitio de lesión (Venero JL, 2000). El hecho que prácticamente no existan cambios en el nivel de RNAm de BDNF ni de TrkB en la SNc asociados a la lesión mecánica, y la observación clara de niveles elevados de ambos mensajeros en el estriado así como en el sitio de lesión, sugieren que BDNF y su receptor pudieran estar involucrados con la estrategia

de reinervación, más que con el mantenimiento de la población dopaminérgica en la SNc posterior a la axotomía.

La utilización de la neurotoxina 6OHDA en el sistema nigroestriatal, es uno de los modelos más populares de lesión selectiva para neuronas dopaminérgicas, ya que mimetiza en algunos aspectos la sintomatología de la enfermedad de Parkinson; por lo que en este modelo, también se ha explorado el mecanismo de acción de BDNF y su receptor.

De este modo, la administración de 6OHDA en el sistema nigroestriatal ha mostrado duplicar el nivel de BDNF en el núcleo estriado y triplicar el mismo en la SNc lesionada dos semanas posteriores a la lesión, respecto a los núcleos contralaterales (Zhou J, 1996). Sus resultados sugieren que el incremento en la expresión de BDNF constituye parte de la respuesta fisiológica compensatoria del daño en el sistema nigroestriatal. Otros grupos de investigación han estudiado asimismo el efecto de la lesión neurotóxica con 6OHDA en ratas jóvenes y envejecidas (Yurek DM, 2000 y 2001), encontrando que dos semanas y cuatro semanas después de la lesión, el nivel estriatal de la proteína BDNF se incrementa en el mesencéfalo ventral en ambos grupos de edad. Pese al incremento de BDNF en la SNc lesionada, menos de la mitad de los animales envejecidos aumentaron la cantidad de BDNF en el estriado lesionado, y este incremento fue menor comparado con aquel presente en los animales jóvenes. Estos datos sugieren que la capacidad de síntesis de BDNF en respuesta al daño, es una cualidad que sufre un detrimento relacionado con la edad. Otra manera de inducir daño a una población particular de neuronas, es mediante la destrucción de sus núcleos blanco, con lo que ocurre degeneración transináptica. En experimentos individuales hechos por Canudas (2005) y Rite (2005), se observó que posterior a la lesión estriatal con ácido kaínico o quinolínico, ocurre un sobrerregulación del RNAm de BDNF en la SNc ipsilateral a la lesión 24 horas después de la lesión (Canudas AM, 2005; Rite I, 2005).

Canudas observó una sobrerregulación del BDNF en la en SNc ipsilateral a la lesión estriatal con ácido kaínico. Este incremento en el nivel de BDNF ocurrió animales del día posnatal 15 y adultos, mientras que los animales más jóvenes del día posnatal 7, no mostraron incremento en el nivel de BDNF concomitante a la lesión estriatal. Adicionalmente, el número de neuronas TH⁺ en la SNc disminuyó únicamente en el grupo más joven. El

efecto protector inducido por BDNF, se eliminó al utilizar proteínas de fusión tipo TrkB- IgG en la SNc posterior a la lesión estriatal con ácido kaínico.

3.8. El BDNF como Neuroprotector

Existe evidencia respecto al papel protector del BDNF sobre las neuronas dopaminérgicas en condiciones *in vivo* e *in vitro*, cuando este se aplica previo o paralelo a un reto neurotóxico.

En estudios *in vitro* de cultivos nigrales pretratados con BDNF y posteriormente expuestos a las toxinas 6OHDA o MPP+, se encontró una menor proporción de muerte celular comparada con los cultivos control (30% vs 70%) (Spina MB, 1992). Otro estudio hecho en cultivos organotípicos de mesencéfalo, se evaluó el efecto de los factores tróficos BDNF y GDNF aplicados de manera individual o conjunta, sobre la acción de la neurotoxina 6OHDA, en función del número de neuronas TH⁺ supervivientes. Ambas proteínas fueron probadas mediante la aplicación previa, paralela y posterior a la toxina al cultivo; encontrando un efecto significativo del BDNF cuando la aplicación ocurrió individualmente previa al daño inducido por la neurotoxina. A la par, los niveles de RNAm de TH se incrementaron y se indujo ramificación de las neuronas TH⁺ sobrevivientes (Stahl K, 2011).

Otros estudios *in vivo* han documentado que la aplicación de BDNF por dos semanas, iniciada inmediatamente después de la transección proximal del MFB, previene la pérdida de neuronas dopaminérgicas en un 50% comparado con los animales con infusión control, teniendo un mayor efecto protector sobre las neuronas de la SNc rostral (Hagg T, 1998).

Otro abordaje experimental donde se ha probado el efecto neuroprotector de BDNF es aquel donde se transplantan neuronas dopaminérgicas embrionarias a hospederos hemiparkinsonianos. En estos estudios, se ha encontrado que el pre-tratamiento de los cultivos con BDNF incrementa la funcionalidad del implante reflejado por la disminución en la conducta de giro inducido por anfetamina, 3 semanas posteriores al trasplante (Zhou J, 1997). Asimismo, la administración intraventricular de BDNF (Sauer H, 1993) o al interior del cultivo transplantado (Yurek DM, 1996) favorece la supervivencia de las neuronas TH⁺ en el trasplante, así como la reducción en la conducta de giro inducida por anfetamina.

En un tercer abordaje experimental se han utilizado células de estirpe celular distinta a la dopaminérgica, especialmente modificadas para la producción de BDNF. En este protocolo experimental, las células son transplantadas a hospederos adultos previo o posterior al daño del sistema dopaminérgico. En estos experimentos se ha encontrado que la implantación de fibroblastos productores de BDNF en el estriado de ratas adultas previo a la administración estriatal de 6OHDA, previene parcialmente de la desnervación y protege contra la muerte de las neuronas dopaminérgicas nigrales (Levivier M, 1995).

El surgimiento de la terapia neurotrófica orientada a la transferencia de genes, en lugar de la administración de péptidos funcionales ha permitido inducir la expresión de genes específicos a poblaciones celulares de interés. En esta línea experimental, Klein (1999) utilizó un vector viral adenoasociado, para transferir genes exógenos para transducir a las neuronas nigrales para la producción simultánea de las proteínas BDNF y la proteína verde fluorescente (GPF). Seis meses después de la transducción, tiempo en el cual los animales conservaban la expresión de ambas proteínas transgénicas, estos fueron lesionados con 6OHDA. Los resultados de este estudio sugieren que la expresión a largo plazo de BDNF induce neuroprotección, ya que se logró una inhibición del desarrollo de la conducta de giro inducida por amfetamina 10 semanas posteriores a la lesión (Klein RL, 1999).

En otro protocolo similar se transfirieron los genes BDNF, GDNF o ambos al núcleo estriado utilizando un vector viral HSV-1, 4 semanas previas a la lesión estriatal con 6OHDA (Sun M, 2005). Los animales fueron evaluados con apomorfina por dos meses a partir de la tercera semana posterior a la lesión en todas las condiciones experimentales. En estas condiciones, la transducción estriatal con BDNF produjo la menor tasa de protección de la población dopaminérgica, comparada con la de GDNF y la acción conjunta de BDNF-GDNF; se encontró que, diez semanas posteriores a la lesión, los animales transplantados con el gen BDNF mostraron una reducción significativa en el giro inducido por apomorfina, respecto a los animales con transducción control. Asimismo, la población dopaminérgica nigral sometida al estrés oxidativo por 6OHDA se redujo al 20% de su contraparte en la SNc intacta, mientras que en la SNc pre-transducida con BDNF la población de neuronas TH⁺ fue del 33% comparada con la condición de sólo lesión sin neuroprotección.

Estos hallazgos sostienen que BDNF es capaz de limitar el daño al sistema nigroestriatal si su administración ocurre previamente. Sin embargo, aun cuando los resultados obtenidos en estos modelos experimentales son muy alentadores, dada la ausencia de herramientas que permitan predecir con precisión la aparición futura de la EP, resulta poco viable la alternativa de la utilización de BDNF como neuroprotector en los humanos.

Aunque la mayoría de los trabajos sostienen el efecto neuroprotector de BDNF sobre las neuronas dopaminérgicas, existen también algunos trabajos que vislumbran su efecto regenerador posterior al daño neurotóxico sobre el sistema nigroestriatal. En esa línea, Yoshimoto Y (1995) implantó astrocitos modificados para la producción de BDNF en el núcleo estriado 15 días posteriores a la lesión de la SNc ipsilateral con 6OHDA. En este trabajo BDNF redujo la conducta de giro inducida por anfetamina en un 45%, un mes después del trasplante y produjo una tendencia a reducir el giro con apomorfina. Pese a la reducción del desbalance en ambos sistemas dopaminérgicos evaluada mediante la inducción farmacológica de conducta giro, no se encontraron fibras TH⁺ emergiendo del trasplante hacia el estriado lesionado del huésped. En estudios recientes realizados en un xenotrasplante de células troncales de mesénquima (MSC) humano modificadas para producir BDNF y después transplantadas a la SNc lesionada, se encontró que las MSC inducían el fenotipo dopaminérgico, así como la hipertrofia de las neuronas TH⁺ y el incremento de la inmunorreactividad de tirosin hidroxilasa estriatal, paralelo a la estabilización de la conducta de giro inducida por anfetamina (Somoza R, 2010).

3.9. El BDNF en Encéfalos Humanos con Enfermedad de Parkinson

Aunado a los estudios en modelos animales, existen datos que sostienen que el BDNF se expresa tanto en condiciones normales como patológicas en los cerebros humanos adultos. En este contexto, se ha documentado que el RNAm de BDNF en los pacientes con EP ocurre una reducción del 70%, respecto a la población sana, y que esta pérdida podría estar relacionada a la pérdida de las neuronas dopaminérgicas que caracteriza esta condición patológica (Howells DW, 2000).

En otro estudio donde evalúan la presencia de la proteína BDNF en mesencéfalos de pacientes control y con EP *post-mortem*, mediante el uso de anticuerpos, han encontrado que el 65% de las neuronas altamente pigmentadas de la SNc, expresan BDNF en condiciones control, y que en los mesencéfalos afectados con EP esta población se reduce al 9% (Parain K, 1999). Es decir, las neuronas pigmentadas en los mesencéfalos humanos que son predominantemente dopaminérgicas, expresan en mayor proporción BDNF y que tal expresión es condicionante de una mayor vulnerabilidad durante la EP. Este estudio reporta adicionalmente que la población dopaminérgica no-pigmentada de la SNc se reduce sólo al 24% comparada con el 9% de las neuronas pigmentadas en los pacientes con EP, respecto a los pacientes control. Los autores sugieren que por tanto BDNF no constituye un factor protector para estas neuronas. Sin embargo, una interpretación alterna podría apuntar por la dependencia dopaminérgica a la síntesis paracrina de BDNF para su supervivencia.

Por otra parte, se ha documentado por hibridación *in situ* la amplia distribución del receptor de BDNF, TrkB en encéfalo humano en adultos sanos y pacientes con EP *post-mortem*. El receptor de BDNF se encuentra expresado en ambos casos en áreas como la corteza cerebral, cerebelo, núcleo estriado, núcleo basal de Meynert, núcleo pedunculopontino y sustancia negra; sin embargo, pese a la reducción en el número de neuronas dopaminérgicas que expresan TrkB asociada a la neurodegeneración que ocurren en la EP, las neuronas remanentes no muestran reducción en el nivel de expresión del receptor TrkB (Benisty S, 1998).

Recientemente, en estudios funcionales del DAT estriatal hechos con tomografía computarizada por emisión de positrón único (SPECT) en pacientes parkinsonianos, revelaron que la degeneración estriatal está correlacionada positivamente con los bajos niveles séricos de BDNF, así como con la pérdida de la función del transportador de dopamina (Zeibell M, 2012). Tomados en conjunto, los reportes anteriores apuntan a la existencia de una relación entre BDNF y su receptor, en la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en el parkinsonismo.

3.10. El Receptor de Alta Afinidad para Neurotesina en las Neuronas Dopaminérgicas Nigrales

Un requisito previo que resulta fundamental para la transferencia génica mediante la utilización del NT- PLX, es que la población a transfectar posea el receptor de alta afinidad para el péptido Neurotensina (NTS-R1). Por lo que, para fines de este trabajo es pertinente abordar la presencia del receptor NTS-R1 y los mecanismos de acción celular que tiene la neurotensina en la población dopaminérgica nigral.

Los primeros datos sugerentes de la relación entre la neurotensina (NTS) y el sistema dopaminérgico, fueron hallados en experimentos donde la administración intracerebroventricular de NTS ocasionaba hipotermia a ratas lesionadas con 6OHDA (Nemeroff CB, 1988). Estudios posteriores han demostrado que la NTS actúa sobre los núcleos dopaminérgicos de los sistemas mesolímbico y nigroestriatal, ya que existe una densa cantidad de plexos inmunorreactivos a NTS y receptores de NTS en áreas circundantes a la SNc y VTA en el mesencéfalo de roedores (Beaudet A, 1982).

El análisis hecho por microscopía electrónica ha demostrado que existen contactos directos entre terminaciones axónicas inmunorreactivas a NTS con los somas y dendritas de neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo (Woulfe J, 1989; Castel MN, 1992). Por otra parte, la aplicación retrógrada de NTS en el núcleo estriado, principal sitio de terminación de las fibras dopaminérgicas de la SNc ipsilateral, han de mostrar que la gran mayoría de la NTS aplicada, se deposita próxima al soma, sobre la membrana plasmática de procesos axónicos y dendríticos, axones, así como en asociación con organelos membranales en la SNc y VTA (Castel MN, 1992). Aunque en menor proporción una cantidad significativa NT fue localizada sobre el núcleo de las neuronas en la SNc. Los hallazgos anteriores constituyen evidencia no sólo del transporte retrógrado de la NTS hacia la SNc, sino también de su unión a receptores específicos, internalización y posible regulación génica en las neuronas dopaminérgicas de la SNc.

Derivado de los experimentos hechos sobre el transporte retrógrado de NTS hacia la SNc, se observó que la infusión de NTS estriatal inducía un incremento transitorio en un 40% en el número de neuronas nigrales que expresan del RNAm de TH, hecho que apoya la idea de que la NT participa en la regulación

de la expresión de genes de las neuronas de la SN en condiciones fisiológicas (Castel MN, 1992).

La NTS que llega a la SNc se origina principalmente de áreas límbicas como el núcleo dorsal central de la amígdala, la llamada “amígdala extendida” o núcleos del lecho de la *stria terminalis* y alcanza principalmente la SNc, VTA y área retrorubral (Vankova M, 1992). La NTS ocasiona despolarización de las neuronas dopaminérgicas, en una activación dependiente de calcio mediada por PKC (St- Gelais F, 2004). Más aún, la aplicación de NTS induce la liberación de DA en la SNc, así como en el núcleo estriado y estimula el recambio y metabolismo dopaminérgico (Faggin MB, 1990).

Por otra parte, se sabe por datos electrofisiológicos que los agonistas dopaminérgicos reducen la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas a través de la acción de autorreceptores D2-D3 en la SNc y VTA (Mercuri NB, 1992). Estudios recientes en cultivos de neuronas dopaminérgicas nigrales han documentado, que la acción de la NTS sobre su receptor de alta afinidad NTS-R1 reduce el efecto fisiológico de la activación del receptor D2, aumentando la tasa de disparo de las neuronas dopaminérgicas (Jomphe C, 2006). Se piensa que parte de la acción neuroléptica de la NTS sobre las neuronas dopaminérgicas del sistema mesolímbico ocurre en virtud de la interacción transmembranal de NTS-R1 con receptores D2 (Fuxe K, 1992).

Estudios recientes han postulado que la acción de la NTS sobre el sistema nigroestriatal no es homogénea sino diferencial y dependiente del punto de la vía en que NTS actúa. Así, la aplicación de NTS en el núcleo estriado, contrarresta la inhibición de la liberación de dopamina estriatal, así como la liberación de GABA en el globo pálido, eventos mediados a través de los receptores D2. En cambio, la administración de NTS en SNc antagoniza la acción de los receptores D2, lo que produce incremento en la liberación de DA e inhibición de la vía GABAérgica nigrotalámica, que en conjunto tendrían un efecto anti-parkinsonico (Antonelli T, 2007).

3.11. El receptor NTS-R1 como Vía para la Transferencia de Genes

Aprovechando de la capacidad de internalización receptor del NTS-R1 en presencia del ligando NTS en múltiples poblaciones celulares, nuestro grupo de investigación, ha logrado la transferencia de genes reporteros, pro-

apoptóticos y neurotróficos a poblaciones celulares que poseen NTS-R1. Tal es el caso de las células tumorales de neuroblastoma (Rubio Zapata HA, 2009) y neuronas dopaminérgicas mesencefálicas (Arango-Rodríguez ML, 2006) ambas en condiciones *in vivo*.

Estudios previos realizados en el laboratorio han demostrado la eficiencia del NT-PLX para transferir el gen del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) a neuronas dopaminérgicas de animales con síntomas francos de hemiparkinsonismo (González Barrios JA, 2006). En este estudio, el GDNF transferido por el NT-PLX a neuronas previamente dañadas con 6OHDA fue capaz de rescatar a las neuronas dopaminérgicas en vías de degeneración, de mantener la innervación nigroestriatal y disminuir las alteraciones motoras en la marcha espontánea y conducta de giro inducido por anfetamina. La literatura referente a la acción neuroprotectora de GDNF como un potente protector de neuronas dopaminérgicas ha sido confirmada en numerosos estudios de lesión del sistema nigroestriatal (Eslamboli A, 2005). Sin embargo, el GDNF es producido principalmente por la población astrocítica que circunda a las neuronas dopaminérgicas (Yang D, 2008), por lo que sería deseable evaluar el efecto que tendría la transducción de las neuronas dopaminérgicas con el NT-PLX utilizando un gen que es expresado de manera fisiológica por las mismas, en el momento en que se inicia el daño que lleva a su degeneración y muerte en la enfermedad de Parkinson.

3.12. El Poliplex de Neurotensina como Herramienta para la Transferencia de Genes Neurotróficos

Con miras al desarrollo de alternativas neurotróficas para el tratamiento de la EP; en nuestro laboratorio se ha desarrollado una herramienta que permite la transferencia génica a células que posean el receptor de alta afinidad a la neurotensina (NTS-R1) (Arango-Rodríguez ML, 2006).

Esta herramienta que ha sido nombrada poliplex de Neurotensina (NT-PLX), es un sistema de nanopartículas autoensamblables y biodegradables, que resulta de la compactación por unión electrostática de DNA plasmídico y un péptido cariofílico (PK) derivado de la proteína de la cápside Vp1 del virus SV40 con el conjugado llamado “acarreador de neurotensina”.

Para fines del presente trabajo, se utilizó como DNA de efecto neurotrófico el plásmido pHDAT- BDNF-flag bajo la regulación del promotor del

transportador de dopamina (DAT), lo cual confiere especificidad en la transfección de neuronas dopaminérgicas.

El acarreador de neurotensina es una construcción hecha mediante la unión del ligando neurotensina (NTS) con el péptido fusogénico (PF) derivado de la hemaglutinina H2A del virus de la influenza, mediante el entrecruzador poli-L-lisina (PLL). En el NT-PLX la NT, actúa de manera similar al ligando endógeno neurotensina, de modo que al estar en contacto con el NTR1 induce la endocitosis mediada por el receptor. Una vez en el interior del endosoma, el PF ejerce su acción de liberación del complejo NT-PLX ya que sufre un cambio conformacional al contacto con el pH ácido del endosoma (Navarro Quiroga I, 2002). Una vez liberado del endosoma, el complejo es guiado hacia el núcleo celular en virtud del PK. El complejo NT-PLX o la parte plasmídica del mismo llega al núcleo por el sistema de importinas básicas donde finalmente es transcrito para desencadenar la acción biológica correspondiente (Arango-Rodríguez ML, 2006).

4. HIPÓTESIS

La transferencia del gen BDNF-flag utilizando el NT-PLX, a neuronas dopaminérgicas remanentes después de la lesión retrógrada con el neurotóxico 6-OHDA, promoverá la sobrevida y reinervación hacia el núcleo estriado, paralelo a la recuperación motora y neuroquímica.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Animales

Se utilizaron 65 ratas macho adultas de la cepa Wistar, de un rango de peso de 210- 230 gramos. Los animales fueron criados en las instalaciones de la UPEAL hasta alcanzar el peso requerido para los procedimientos experimentales posterior a lo cual, fueron asignados aleatoriamente a los tratamientos. La manipulación de los animales se realizó de acuerdo a los términos bioéticos establecidos por la UPEAL protocolo # 0109-02, en todo caso minimizando el sufrimiento en todos los procedimientos realizados.

5.2. Cirugía Estereotáxica

Previo a la cirugía de lesión o transducción, los animales fueron anestesiados mediante la aplicación intraperitoneal de una mezcla de ketamina (70 mg/kg) - xilazina (6 mg/kg). Bajo anestesia profunda, los animales fueron colocados en el aparato estereotáxico; posterior a la trepanación craneal con un taladro dental, los animales recibieron una sola inyección de 3 μ L de 6OHDA base libre (6.7 μ g/ μ L), disuelto en amortiguador de fosfatos (PBS) 0.1 M con 0.2% de ácido ascórbico como antioxidante. La neurotoxina 6OHDA fue preparada al momento de la aplicación, y preservada a 4°C en oscuridad a fin de evitar su degradación. Los animales control de la cirugía de lesión recibieron asimismo 3 μ L de PBS con 0.2% de ácido ascórbico omitiendo la neurotoxina 6OHDA. En ambos casos, la solución tóxica y control fueron administradas utilizando una aguja dental a un flujo de 0.25 μ L/min. Al finalizar cada inyección, se permitió la difusión por 5 minutos y se retiró lentamente.

Las coordenadas utilizadas para la lesión o lesión falsa en el estriado dorsal izquierdo fueron: AP, 0 mm; ML + 4 mm, DV, 5.2 mm; tomando la coordenada DV (dorsoventral) a partir de la duramadre y la coordenada AP (anteroposterior) a partir de bregma. Estas coordenadas corresponden a la parte del estriado anterior y dorsal a la comisura anterior tomando como referencia el atlas de Paxinos y Watson (Figura 3).

Después de la cirugía, los animales fueron colocados en sus jaulas, donde permanecieron los siguientes 7 días para su recuperación. Los animales recibieron alimentos y agua *ad libitum* en un ciclo normal de luz: oscuridad de 12:12. La transfección fue hecha en la SNc ipsilateral en las coordenadas: AP, - 5.4 mm de bregma; ML, + 1,5 mm, DV,-6.8 mm, tomadas a partir de la duramadre. Cada animal recibió una única dosis intranigral de 3 μ L de NTS-PLX o DMEM (que denominamos transfección falsa) a un flujo de 0.25 μ L/min. La cantidad total de pDNA inyectado fue 555 ng/3 μ L para phDAT-BDNF- flag y 631 ng/3 μ L para phDAT-EGFP.

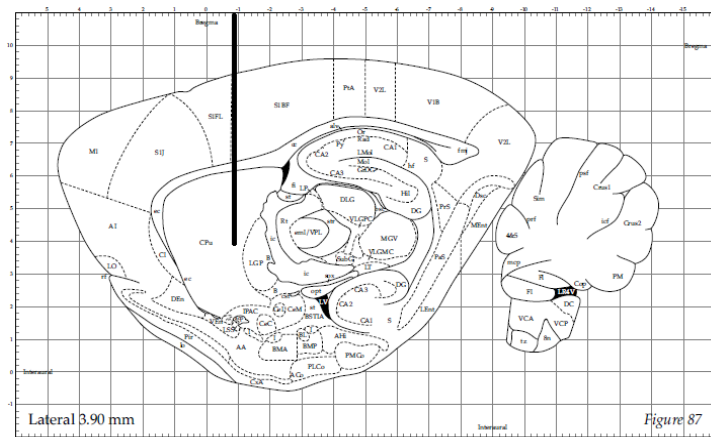
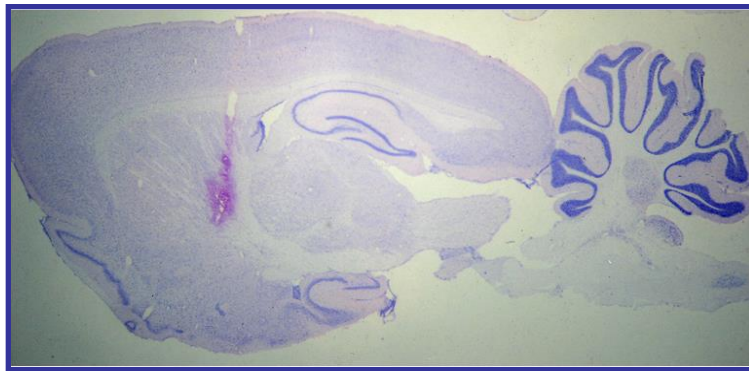


Figura 3. A) Coordenada del sitio de lesión correspondiente a la porción antero-dorsal del núcleo estriado; mostrada en corte parasagital teñido con la tinción de violeta de cresilo. B) Esquema del corte anterior, tomado de Paxinos y Watson (2006).

5.3. Síntesis del NT- PLX

Para fines de este trabajo, describiremos brevemente el procedimiento de síntesis del PLX-NT, ya que la descripción de tal procedimiento se ha detallado en publicaciones previas de nuestro laboratorio (Arango Rodríguez ML, 2006).

En un primer paso, la neurotensina (NTS) (Sigma; Saint Louis, MO, USA) y el péptido fusogénico modificado de la hemaglutinina–HA2 del virus de la influenza (GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCAKKK; purity >90%; SynPep; Dublin, CA, USA) se entrecruzan con poli-L-lisina (masa molecular media 48 kD) utilizando el entrecruzador LC- SPDP (N-succinimidil 6-[3-(2-piridilditio) propionamido] hexanoato; Pierce Chemical Co, Rockford IL, USA). Mediante la técnica cromatográfica de exclusión molecular por filtración en gel, se purificaron los derivados de SPDP y el conjugado resultante de la unión, el NT-

SPDP- PF que para fines experimentales llamamos “acarreador de neurotensina”.

El acarreador de neurotensina, se concentró por diálisis en solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.4) hasta tener un volumen total de 1 mL. Posteriormente, este concentrado se esterilizó por filtración.

Previo a su utilización, se estima la relación óptima de cada uno de los componentes de NT-PLX mediante geles de retardo y retención, que permiten anticipar respectivamente, la concentración idónea de DNA y PK a utilizar en cada NT-PLX. De este modo, para fines de este trabajo el DNA plasmídico se utilizó a una concentración de 6 nM, la concentración de PK 505 μ M y el acarreador de NT a una concentración de 252 nM; de tal modo, la relación molar óptima para el NT-PLX utilizando como DNA el plásmido phDAT-BDNF-flag o el plásmido phDAT-GFP fue de (1: 42).

Justo antes de su aplicación intracerebral, los NT- PLX fueron preparados en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA) mediante la unión electrostática del acarreador de NT y el péptido cariofílico Vp1-SV40 (MAPTKRKGSCPGAAPNKPK; 90% purity; Synpep Corp., Dublin, CA, USA) con el DNA plasmídico. Los detalles de esta metodología se describen en trabajos previos de nuestro laboratorio (Arango-Rodríguez ML, 2006).

5.4. Plásmidos

El plásmido phDAT-BDNF-flag (10.511 kbp) que codifica para el gen BDNF-flag, bajo control del promotor hDAT (transportador de dopamina) fue utilizado como gen neurotrófico en este trabajo. El plásmido phDAT-BDNF-flag fue obtenido a partir de la secuencia

BDNF-flag de 868 pb en NotI-Sall de phDAT-EGFP-N1 (Navarro Quiroga, 2002; Arango-Rodríguez ML, 2006). En un primero paso, un fragmento de restricción de 847 pb removido del plásmido pAD1-BDNF-flag utilizando la enzima Hind III y NotI, fue subclonado en un plásmido pBluescript SK (+), generando así el plásmido pBluescript SK(+)-BDNF-flag. En este plásmido se secuenciaron el fragmento codificante para de BDNF de 847 pb, la etiqueta flag y los sitios flancos de restricción. Posteriormente, el gen BDNF-flag de 868 pb fue restringido con las enzimas XhoI-NotI del plásmido pBluescriptSK(+)-BDNF-flag y subclonado en los sitios Sall-NotI del plásmido

phDAT-EGFP-N1, reemplazando al fragmento GFP-N1 (762 pb) y generando finalmente al plásmido de trabajo phDAT-BDNF-flag (10.511 kbp).

El plásmido pDAT-EGFP-N1 (10.45 kbp) que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), bajo control del promotor hDAT (transportador de dopamina); fue obtenido a partir de la clonación de la región regulatoria de 6250 bp de hDAT, a Eco47III-Bgl1III de pCMV-EGFP1-N1 (Clontech, Palo Alto, CA, USA) (Arango-Rodríguez ML, 2006).

5.5. Análisis Histológico

Al término de las evaluaciones conductuales, los animales fueron perfundidos vía punción transcardiaca con 30 mL de PBS 0,1 M seguido de 250 mL de paraformaldehído al 4% en PBS. Los cerebros fueron extraídos cuidadosamente de los cráneos y fueron crioprotegidos en una solución de sacarosa al 30% en 4 °C por dos días. Posterior a esto mediante el uso de un microtomo de deslizamiento por congelación, se hicieron cortes coronales de 30 µm de grosor, de las regiones de la SNc y el estriado. Para ambas áreas, se colectaron todos los cortes consecutivos y se distribuyeron en cinco series; de modo de obtener niveles comparativos en el eje antero- posterior de la SNc y el estriado. Únicamente una de las series, seleccionada al azar fue procesada con inmunohistoquímica contra tirosina hidroxilasa (TH), un marcador de neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo ampliamente utilizado.

Después de lavar los cortes con PBS, estos fueron incubados con una solución de PBS con 1% de peróxido de hidrógeno y 2% de suero de caballo por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes fueron permeabilizados con PBS Tritón X-100 0.3% (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO), e incubados con el anticuerpo primario monoclonal anti-TH (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) (dilución 1:1000) por 16 horas a 4°C. Después de lavar con PBS Tritón X-100, 0.02%, las rebanadas se incubaron con el anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón hecho en caballo (Vector de laboratorios, Burlingame CA) en la dilución 1:200 por 2 hrs a temperatura ambiente. La visualización de los sitios inmunorreactivos se llevó a cabo utilizando la reacción enzimática de la peroxidasa usando como sustrato a la diaminobenzidina, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (VectaStain Elite ABC, laboratorios Vector).

Al finalizar el proceso de inmunohistoquímica, las preparaciones fueron lavadas con PBS y montadas en portaobjetos gelatinizados, posterior a lo cual

fueron contrateñidas con violeta de cresilo y cubiertas con el polímero Entellan (Merck KGaA). El registro de la información obtenida a partir de la inmunohistoquímica anterior se realizó obteniendo imágenes digitalizados con un microscopio Leica DMIRE2 DC300F (Nussloch, Alemania).

5.6. Conteo Celular

A fin de realizar los conteos representativos de cada grupo experimental, se obtuvieron imágenes en campo claro utilizando el objetivo 20X. Fueron tomadas en promedio 40 micrografías por cada SNc (unilateral) de cada cerebro correspondiente a cada tratamiento y sus correspondientes núcleos contralaterales intactos. Un total de 15 animales (3 por cada grupo experimental) fueron considerados para el conteo de las neuronas inmunorreactivas para TH. Únicamente aquellas neuronas con inmunorreactividad intensa fueron consideradas en el conteo, principalmente aquellas neuronas localizadas en la SNc, se consideró el espacio interpeduncular como límite divisorio medial entre las SNc derecha e izquierda y el área ventral tegmental (VTA) (Oades RD, 1987). Con la finalidad de sistematizar el conteo de las neuronas TH-positivas, se obtuvieron de 2 a 3 micrografías de luz visible por corte con el objetivo 20X en un microscopio Leica DC300F. Un total de 25 a 30 micrografías por SNc de cada condición fueron consideradas para la cuantificación. El conteo se realizó por duplicado mediante el análisis manual del número de neuronas, así como digitalización de las imágenes y la estimación de la cantidad de píxeles representativos de cuerpos celulares. Este último procedimiento, así como la cuantificación de la densidad de fibras TH-positivas presentes en la SNc y estríados de todas las condiciones experimentales, se realizó utilizando el conteo automático del programa v.1.46r Image J.

5.7. Dobles Inmunofluorescencias

La presencia de NTSR1 y la expresión de BDNF-flag o GFP en las neuronas nigrales TH-positivas fueron mostradas por el método de inmunofluorescencia doble. Una de las series de cortes coronales de 30 μm de la SNc de cada condición experimental se procesó mediante el siguiente protocolo: Se bloquearon los sitios inespecíficos de unión al anticuerpo con una

solución de PBS con 5% de suero de caballo en PBS por 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS, los tejidos se permeabilizaron con una solución de PBS Tritón TX-100 al 0.3%. Después de ser permeabilizados, los cortes se incubaron por 16 horas a 4°C con los anticuerpos primarios anti-TH hecho en conejo (1:300 dilución; Chemicon; Temecula, CA) y un anti-Flag hecho en ratón (1:400 dilución; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) o anti-GFP hecho en ratón (1:400; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO). Después de lavar, los cortes fueron incubados en la dilución 1: 400 con los respectivos anticuerpos secundarios anti-conejo hecho en cabra FITC (dilución 1:400; Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.; West Grove, PA, USA) y anti- ratón hecho en burro TRITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. West Grove, PA, USA).

La presencia de NTSR1 en las neuronas TH-positivas se determinó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-TH (1:400; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) y un anticuerpo anti-NTSR1 hecho en cabra (1:400; Sigma). La colocalización de la señal TH-positiva con BDNF-flag, GFP o NTSR1 fue evaluada mediante la adquisición de imágenes de microscopia confocal.

5.8. Evaluación Conductual

5.8.1. Conducta Motora Espontánea en Campo Abierto

La conducta motora espontánea es un indicador del movimiento que cada animal exhibe en condiciones basales, y por tanto es susceptible de alterarse por factores que estimulen, inhiban o modifiquen las características normales de motricidad. Tal es el caso de algunos fármacos, estrés o lesiones en áreas cerebrales relacionadas con el movimiento, como las realizadas en este trabajo.

A fin de evaluar las condiciones de motricidad en cada tratamiento experimental, los animales fueron sometidos a la prueba de movimiento espontáneo en campo abierto durante 30 minutos. Con el objetivo de evitar la interferencia con las pruebas farmacológicas de giro, esta prueba de motricidad espontánea se realizó al inicio de cada serie de evaluaciones conductuales.

Para evitar el efecto del estrés sobre la motricidad, los animales fueron habituados al cuarto de experimentación 24 horas antes del experimento. La actividad motora en un entorno nuevo, se evaluó colocando individualmente

a los animales en una caja de madera (60 cm X 60 cm X 50 cm de altura por pared) cuadrada pintada de negro, colocada en el centro del cuarto de evaluación (Zamudio S, 2005).

El tiempo total de evaluación fue de 30 minutos dividido en intervalos de 3 minutos. Al finalizar cada experimento, la caja se limpió a fin de evitar la interferencia de señales olfatorias entre animales consecutivos. La actividad motora fue grabada en video y analizada en el equipo Videomex-V (Columbus, OH, Estados Unidos). Los parámetros de movimiento analizados fueron: la distancia recorrida, el tiempo en movimiento ambulatorio, el tiempo en descanso y el tiempo en movimiento considerado estereotipado, tal como el rascado, el movimiento corto (y repetitivo) de la cabeza y el acicalamiento corporal o facial. Para evitar el posible efecto del aprendizaje, esta prueba se realizó solo una vez a cada animal como inicio de la evaluación conductual posterior a cada tratamiento.

5.8.2. Conducta de Giro

Las pruebas conductuales en donde se utilizan fármacos con efecto sobre el sistema dopaminérgico, permiten evidenciar alteraciones motoras que de otro modo serían imperceptibles. Este es el caso de la conducta de giro inducido por anfetamina, que funciona como un competidor de las catecolaminas para la internalización en vesículas, y la apomorfina, un agonista dopaminérgico no selectivo.

Ambas conductas de giro inducido por fármacos, han sido ampliamente utilizadas para evaluar el desbalance en la dopamina liberada en el estriado (anfetamina) y el desarrollo de hipersensibilidad en los receptores dopaminérgicos en el estriado desnervado (apomorfina), en los modelos murinos de hemiparkinsonismo (Hudson JL, 1993).

En este trabajo, se utilizaron ambos fármacos de manera independiente de acuerdo al siguiente protocolo: los animales en los distintos tratamientos recibieron una inyección intraperitoneal de 8 mg/kg de met-anfetamina (Sigma-Aldrich; MO); después de lo cual fueron colocados en el interior un girómetro automatizado, asidos holgadamente a un cable a través de un arnés, de modo que se permita el movimiento libre. La asimetría en ambos sistemas dopaminérgicos se evaluó mediante el conteo de los giros completos en dirección ipsilateral a la lesión inducido por anfetamina durante 90 minutos. La

conducta de giro inducido por anfetamina se evaluó 8 días posteriores a la lesión y dos semanas posteriores a la transfección con BDNF-flag, GFP, transfección falsa con DMEM o ausencia de transfección. La conducta de giro de aquellos animales que tuvieron 1000 ó más giros ipsilaterales 8 días después de la lesión con 6-OHDA, se estableció como criterio de selección para asignar a los animales a los grupos de transfección con BDNF-flag, GFP, DMEM o la ausencia de transfección, como evidencia de la progresión normal de la lesión neurotóxica.

Para evaluar el giro inducido por apomorfina se administró por vía subcutánea 0.5 mg/kg/ de apomorfina (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA); posterior a lo cual los animales fueron colocados de manera individual en los girómetros. Esta conducta se evaluó 9 días posteriores a la lesión y dos semanas (+ 1 día) posteriores a la transfección con BDNF-flag, GFP, transfección falsa con el medio DMEM.

5.9. Análisis Estadístico

Tanto para los datos histológicos como para los conductuales, se utilizaron pruebas paramétricas de t- Student de medidas repetidas para comparar las diferencias entre el mismo animal antes y después de cada tratamiento y de análisis de varianza (ANOVA) de una sola vía para grupos independientes, para comparar diferencias entre grupos experimentales. Las pruebas y gráficas fueron hechas con el programa GraphPad Prism 4 (San Diego, CA, USA) y los resultados fueron expresados utilizando la media aritmética (X) y el error estándar (SEM). Para detectar diferencias entre grupos, se utilizó la prueba *post hoc* de Bonferroni. El nivel de significancia aceptado fue $P < 0.05$ para las pruebas t- Student, ANOVAs y la prueba *post hoc*.

5.10. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), Contenido de Dopamina

Una vez concluidos los experimentos conductuales, los animales fueron sacrificados por decapitación bajo anestesia profunda. Los cerebros fueron extraídos rápidamente de los cráneos y colocados en hielo seco, a fin de diseccionar los estriados (ST) y sustantia nigra (SNc) de cada hemisferio. Cada muestra fue almacenada inmediatamente a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las muestras congeladas se homogeneizaron con una solución de ácido perclórico 0.1 M y ácido ascórbico 0.2 mM a 4°C. Las relaciones molares utilizadas (peso/volumen) fueron 1 mg: 800 µL para ST y 0.3 mg: 200 µL para la SNc.

Los homogeneizados se centrifugaron (3000 revoluciones por 2 min) usando una centrifuga Airfuge (Beckman; Fullerton, CA, USA), y los sobrenadantes se filtraron usando membranas de 0.22-µm (Millipore; Bedford, MA, USA). El contenido de dopamina y ácido 3,4- dihidroxifenilacético se determinó en de una sola corrida cromatográfica de 5 µL de cada homogenado previamente procesado, utilizando un equipo de cromatografía de alta resolución (HPLC) (Bioanalytical Systems-CC-5E; West Lafayette, IN, USA) con detección electroquímica (ECD). La fase móvil amortiguadora utilizada contenía NaH₂PO₄ 25 mM, Citrato de sodio 50 mM, EDTA 0.03 mM, clorhidrato de dietilamina 10 mM y 2.2 mM ácido octilsulfónico /sal de sodio, pH 3.2. Un litro de la solución amortiguadora se mezcló con 30 mL de metanol y 22 mL de dimetilacetilamina para formar la fase móvil.

La fase móvil se administró a un flujo de 0.5 mL/min a través de una columna de fase reversa Velosep RP-18 (3 µm, 100 x 3.2 mm; PerkinElmer, Waltham, MA, USA) a 30.5 °C. El potencial de oxidación del electrodo de carbón se fijó en + 0.75 V, respecto al electrodo de referencia (Ag/AgCl RE-6, BAS; West Lafayette, IN, USA) con un detector electroquímico LC-4C (Bioanalytical Systems, West Lafayette, IN, USA). Los cromatogramas se grabaron y analizaron usando el software ChromGraph® 2.34.00 REPORT 2.30© (Software Bioanalytical Systems, Inc.). El contenido de proteína se determinó a partir de las pastillas resultantes de la centrifugación de cada homogeneizado. Estas se resuspendieron en 400 µL de NaOH 0.1 M y procesaron de acuerdo al protocolo para cuantificación de proteínas Coomassie Plus assay kit (Pierce biotechnology Rockford, IL, USA). El contenido de dopamina se expresó en pg DA/µg proteína.

5.11. Reacción en cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa

Se utilizó la reacción en cadena de polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR), para determinar la expresión de los RNA mensajeros (RNAm) de BDNF-flag, GFP, NTSR1 y actina (como gen constitutivo) en las SNc

transfectadas de las condiciones experimentales. La extracción del RNA se realizó utilizando la reacción de Trizol (Invitrogen Corporation Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante . Para amplificar el fragmento de 163 pb de BDNF-flag se utilizó el *primer* sentido 5'-GCAATGCCGAACACTACCCAATC-3' y el *primer* antisentido 5'-CTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTC-3'. Asimismo, para amplificar el fragmento de 608 pb de GFP se utilizó el *primer* sentido 5'-CTGGTCGAGCTGGACGGCGAC-3' y el primer antisentido 5'-AGAGTGATCCCGGCGGGTC-3'. De modo análogo, para el fragmento de 537 pb de NTSR1, el primer sentido fue 5'-CGTAAAGACCTCTATGCCAA-3' y el antisentido fue 5'-ACCTCCTGTTGCTGATCCAC-3'. Para el gen constitutivo actina, se utilizó el *primer* sentido 5'-CGTAAAGACCTCTATGCCAA-3' y el antisentido 5'-ACTCCTGCTTGCTGATCCAC-3'. El protocolo utilizado consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos, seguida de una amplificación a 35 ciclos para BDNF-flag, GFP y actina, y 40 ciclos para NTSR1. Los ciclos consistieron repeticiones sucesivas de desnaturalización a 90 °C por un minuto, reconocimiento (annealing) a 63 °C por 30 segundos para BDNF-flag y GFP, a 60 °C para NTSR1 y actina, seguida de fase de extensión a 72 °C por 30 segundos para BDNF-flag, 36 segundos para GFP y actina, y 45 segundos NTSR1. Los productos de PCR fueron analizados en geles de electroforesis de agarosa al 1.5% o poliacrilamida al 5% (BDNF-flag) y posteriormente teñidos con bromuro de etidio y fotografiados con una cámara Kodak DC290. Los plásmidos control fueron sometidos a las mismas condiciones de RT-PCR.

6. RESULTADOS

6.1. Las Neuronas dopaminérgicas nigrales conservan el NTSR1

Un prerrequisito para hacer posible la transferencia génica con el NT-PLX a cualquier población celular, particularmente las neuronas dopaminérgicas en condiciones de hemiparkinsonismo, es la presencia del receptor de alta afinidad para la neurotensina (NTSR1).

Debido a que la expresión de NTSR1 constituye la piedra angular de este trabajo, el primer resultado comprobable fue demostrar que las neuronas dopaminérgicas que originalmente expresan NTSR1, conservan este receptor

8 días después de ser sometidas al daño inducido por la microinyección estriatal de 6OHDA.

Al hacer la evaluación histológica con la técnica de inmunohistoquímica doble, las imágenes de microscopía confocal revelaron que las neuronas nigrales remanentes que son inmunorreactivas a TH, también conservan el NTSR1. Esta primera evidencia se muestra en la figura 4, donde la inmunorreactividad contra TH se muestra en el canal verde (FITC), la inmunorreactividad que denota la presencia del NTSR1 se muestra en el canal rojo (TRITC), y la colocación de ambas señales como el color amarillo de la imagen sobrepuesta de la izquierda. Cabe recalcar que la totalidad de las neuronas inmunorreactivas a TH poseen NTSR1, tanto en condiciones control como en condiciones de hemiparkinsonismo. Cabe mencionar que el NTSR1 está presente tanto en el soma, así como en los procesos dendríticos de la SNc intacta y lesionada. Este hallazgo, hace a las neuronas dopaminérgicas sobrevivientes al daño neurotóxico, candidatas para ser transfectadas con el NT- PLX.

Dos semanas después de asignar aleatoriamente a los animales con lesión extensa a la transfección con uno u otro gen, se evaluó la presencia de las proteínas transgénicas BDNF-flag y la proteína verde fluorescente (GFP). Para este fin, se realizaron inmunofluorescencias dobles contra el epítipo flag, que posibilita distinguir el BDNF transgénico del endógeno, y por otra parte GFP. En ambos casos, se encontró expresión de las proteínas transgénicas dos semanas posteriores a la transfección con el NT-PLX. La evidencia de la expresión de BDNF-flag en las neuronas TH positivas, se muestra en la figura 5; donde vemos que la señal verde que denota la presencia del marcador dopaminérgico TH se encuentra en ambas SNc intacta y hemiparkinsoniana transfectada. Sin embargo, la señal roja, que representa la presencia de la proteína BDNF-flag se localiza únicamente en las escasas neuronas TH positivas en la SNc lesionada y posteriormente transfectadas con hDAT-BDNF-flag, evadiendo la SNc contralateral.

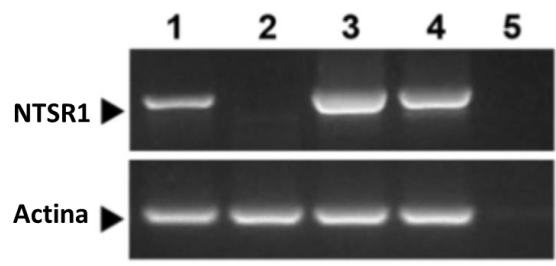
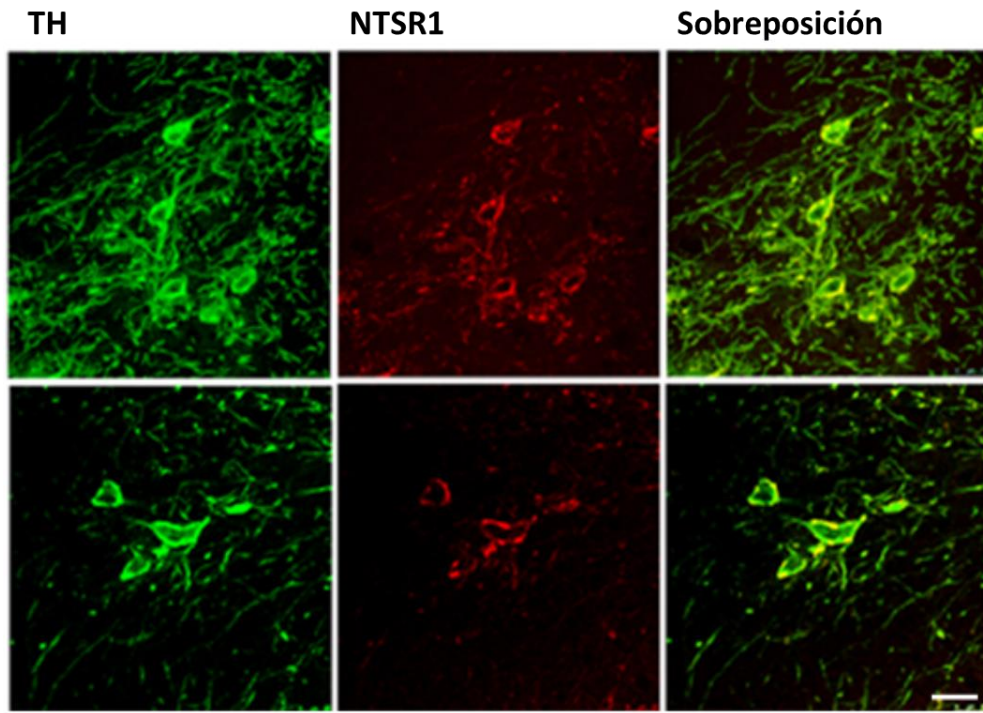


Figura 4. Expresión de la proteína y RNAm de NTSR1 en las neuronas TH-positivo en la sustancia negra una semana después de una lesión estriatal con 6-OHDA, previo a la transfección. En la parte superior se muestran micrografías confocales representativas de un ensayo de inmunofluorescencia doble contra receptor TH y NTSR1 en el mesencéfalo de una rata de hemiparkinsoniana. Las micrografías de control corresponden a la sustancia negra contralateral no sometida al neurotóxico 6OHDA. En la parte inferior se muestran los RNAm NTSR1 en las siguientes condiciones: 1) control positivo, células N1E-115, 2) control negativo, células L929, 3) SNc intacta, 4) SNc lesionada, 5) reactivos de PCR sin cDNA. Se utilizó el gen de actina como gen constitutivo. Escala = 50 μ m.

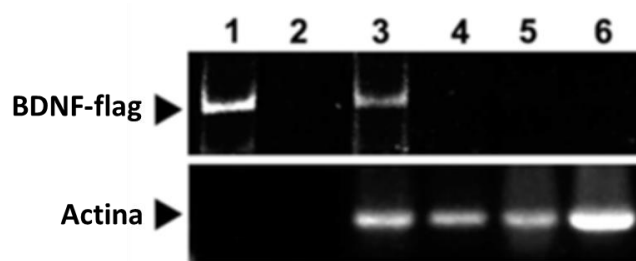
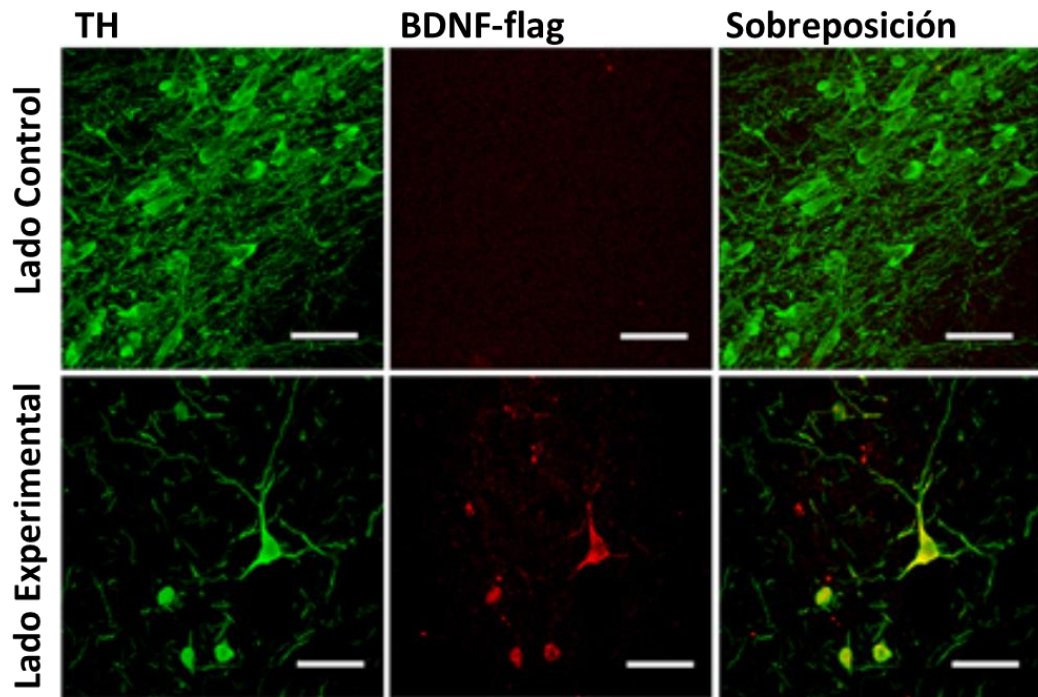


Figura 5. Expresión de la proteína BDNF-flag y su RNAm en las neuronas dopaminérgicas nigrales de ratas hemiparkinsonianas dos semanas después de la transfección con NT-PLX. En la parte superior se muestran micrografías confocales representativas de un ensayo de inmunofluorescencia doble contra TH y flag en el mesencéfalo de ratas hemiparkinsonian. Las micrografías control corresponden a la SNc contralateral (control) Escala = 50 μ m. La parte inferior de la figura muestra los resultados de RT-PCR en las siguientes condiciones: 1) plásmido phDAT-BDNF-flag, 2) Reactivos de PCR sin cDNA (control interno), 3) SNc lesionada y transfectada con phDAT-BDNF-flag, 4) SNc contralateral sin transfección, 5) Estriado Ipsilateral a la transfección, 6) Estriado contralateral a la transfección.

Asimismo, podemos observar en la figura 5, que la expresión de BDNF-flag está circunscrita casi exclusivamente a los somas de las neuronas transfectadas, dato que concuerda con la presencia del mRNA de BDNF-flag en la SNc. Con el fin de demostrar la expresión de la proteína reportera no neurotrófica GFP por las neuronas dopaminérgicas remanentes, se evaluó su presencia por la técnica de inmunofluorescencia doble contra TH y GFP. El análisis de las imágenes tomadas con microscopía confocal revelaron que dos semanas posteriores a la transfección con el plásmido phDAT-EGFP-N1, la expresión de proteína transgénica se localizó en la SNc transfectada (Figura 6).

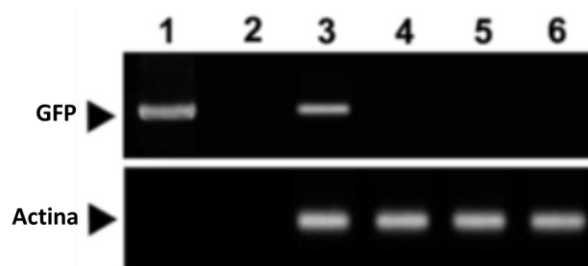
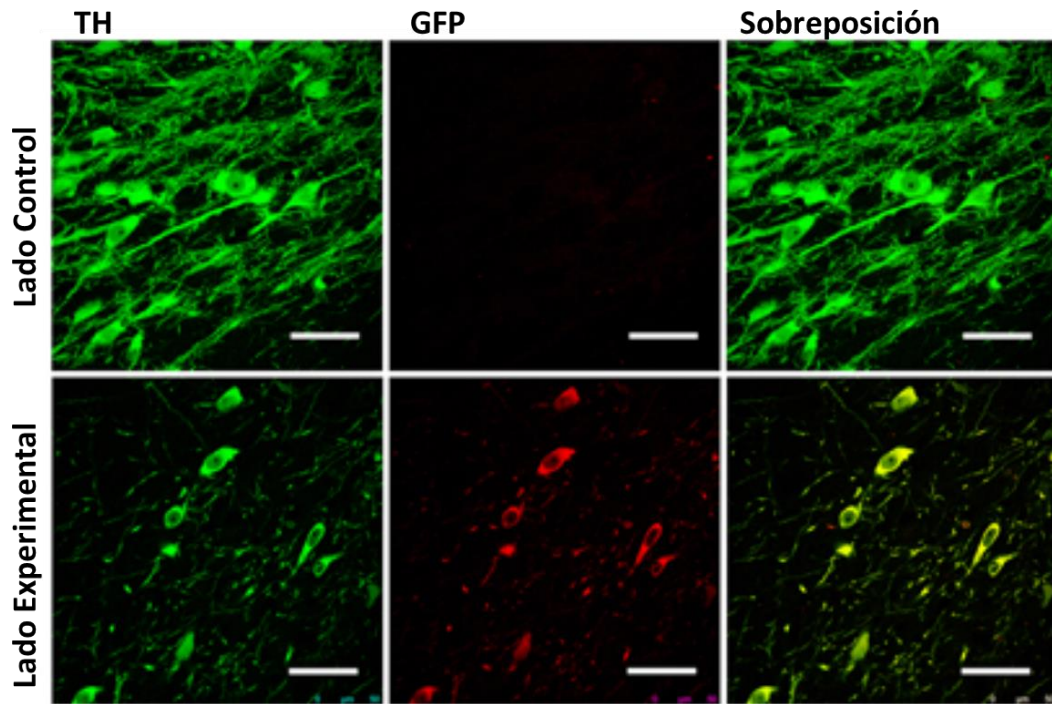


Figura 6. Expresión de la proteína y RNAm GFP en las neuronas dopaminérgicas de la SNc de ratas hemiparkinsonianas, 2 semanas posteriores a la transfección con el NT- PLX. Las micrografías confocales de inmunofluorescencia doble contra TH y GFP. La señal verde (FITC) representa la inmunoreactividad de TH, mientras que la señal roja (TRITC) representa la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en la SNc transfectada. Escala = 50 μ m. La parte inferior muestra los resultados de RT-PCR en las siguientes condiciones: 1) plásmido phDAT-EGFP, 2) reactivos de PCR sin cDNA, 3) SNc lesionada y transfectada con phDAT-EGF, 4) SNc contralateral sin lesión o transfección, 5) Estriado ipsilateral a la transfección, 6) Estriado contralateral a la transfección.

La señal dada por la inmunoreactividad verde (FITC) representa la presencia de TH en ambas, la SNc intacta y la SNc previamente lesionada y transfectada con phDAT-EGFP-N1. En contraste, se observa señal roja (TRITC) únicamente en la SNc trasfectada y previamente lesionada; es de notar también la ausencia de procesos dendríticos en la SNc transfectada en comparación con la intacta, así como la expresión de GFP en la totalidad de las neuronas dopaminérgicas fotografiadas en este campo.

6.2. Recuperación Morfológica

6.2.1 La Arborización en la Sustancia Nigra transfectada con BDNF-flag

Los datos obtenidos a partir de la inmunohistoquímica contra TH en luz visible mostraron que tres semanas después de la administración intraestriatal de 6OHDA, las neuronas dopaminérgicas ipsilaterales al sitio de lesión, sufren degeneración retrograda y la consecuente disminución en el número de neuronas TH positivas, comparadas con la SNc contralateral intacta (Figura 7B,C y D). Concomitante a la pérdida en el número de neuronas TH positivas, se observa una pérdida en la innervación local en la SNc en las condiciones de transfección con el plásmido pHDAT-EGFP, falsa transfección con DMEM y la ausencia de transfección nigral (NT), todas ellas de una progresión de dos semanas postransfección. Contrasta la robusta arborización encontrada en la SNc transfectadas con el plásmido pHDAT- BDNF-flag (Figura 7E).

Al realizar los conteos de las neuronas TH positivas en cada condición, se encontró que todas las condiciones experimentales mostraron una disminución significativa ($P < 0.001$) del 80% comparado con la SNc contralateral en los mismos encéfalos (Figura 7P). A fin de sistematizar el conteo celular, las imágenes se procesaron con el software abierto ImageJ y se contaron el número de píxeles correspondientes al número de neuronas en la SNc de todas las condiciones experimentales (Figura 7F a J), así como la densidad de fibras TH positivas en la SNc (Figura 7K a O) y núcleo estriado (Figura 8) en cada condición experimental. Los resultados del conteo celular y densidad de fibras TH positivas para la SNc se muestran en la figuras 7P y 7Q.

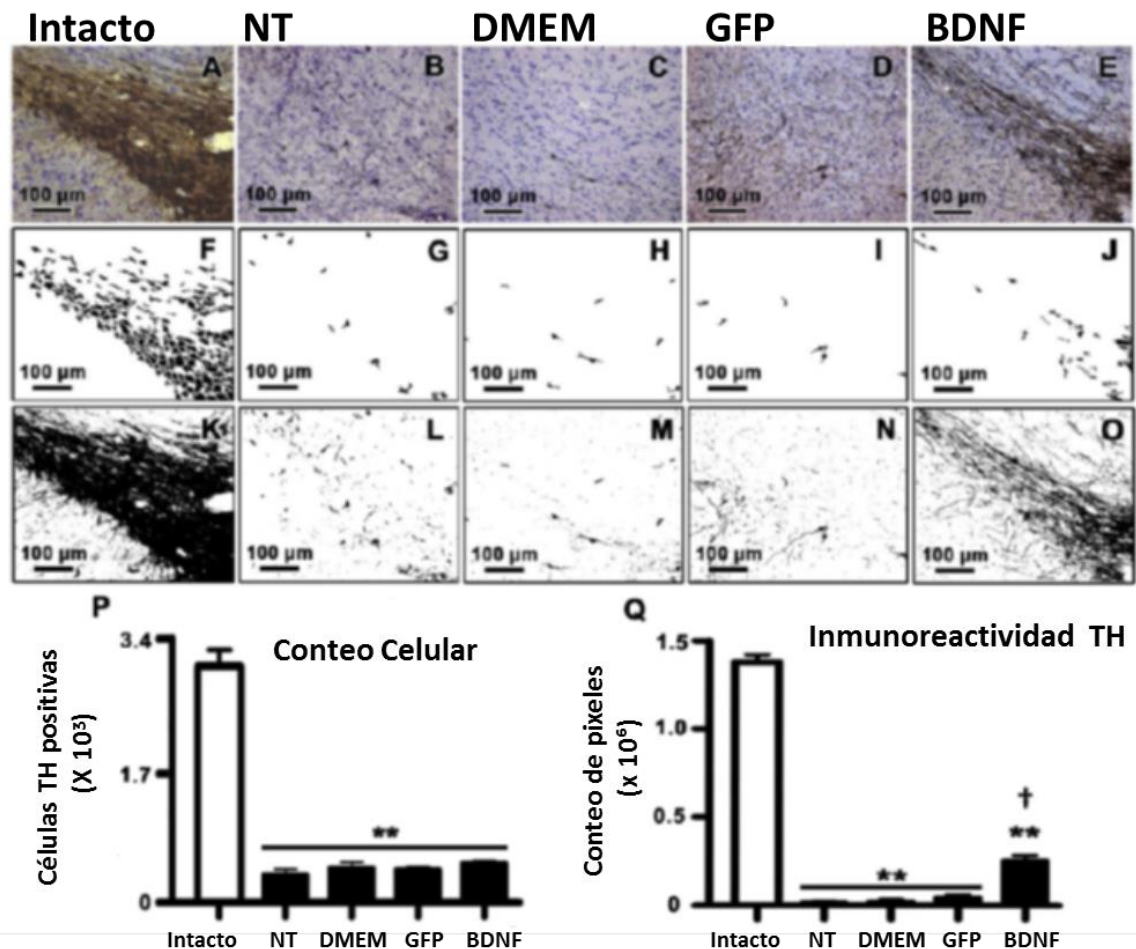


Figura 7. Diferencias morfológicas en la innervación en la SNc intacta (A) y posterior a tratamientos experimentales: B) No transfectado, C) Dos semanas después de la falsa transfección con el medio DMEM, D) Dos semanas después de la transfección con el gen reportero GFP, E) Dos semanas posteriores a la transfección con el gen neurotrófico BDNF-flag. Todas las condiciones experimentales muestran una disminución en el número de neuronas TH positivas de aproximadamente el 80% (F) respecto (H- J) a la población original en condiciones control (F). K-O muestran la densidad de fibras TH positivas en cada condición experimental, así como las diferencias estadísticas de esta comparación. Los valores son expresados como la media + error estándar, tomando una n=3 por cada condición. ** $P \leq 0.001$ comparado con el lado intacto contra condiciones experimentales posteriores a la transfección (NT, DMEM, GFP y BDNF), † $P \leq 0.001$ comparado BDNF contra NT, DMEM y GFP. El análisis se realizó utilizando Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía y prueba *post hoc* de Bonferroni.

6.2.2. Innervación Dopaminérgica Estriatal

Paralelo al incremento en la densidad de fibras TH positivas en la SNc asociada a con la transfección de BDNF-flag, se observó aumento de la inmunorreactividad de TH en estriado previamente lesionado y transfectados con phDAT-BDNF-flag, hallazgo que recupera de manera parcial la innervación dopaminérgica del núcleo estriado lesionado (Figura 8E) comparada con las condiciones control del mismo (Figura 8A). Esta recuperación de la innervación estuvo ausente en las otras condiciones experimentales (Figura 8B- D).

A fin de evaluar de manera cuantitativa el nivel de inmunorreactividad de TH en los núcleos estriados, las imágenes correspondientes a cortes representativos de cada nivel se procesaron con el software ImageJ (Figura 8F-J), y los resultados fueron expresados como el número de píxeles análogo a la densidad de señal inmunorreactiva de TH (Figura 8K).

6.3. Recuperación de los Niveles de Dopamina

Una vez concluida la evaluación conductual una porción de los animales (n=3) de cada grupo experimental fue destinada a la evaluación bioquímica de los niveles de dopamina en la SNc y estriado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los resultados encontrados muestran que, independientemente de la falta de transfección (NT) o la misma utilizando únicamente el medio (DMEM) o los genes reportero (GFP) o neurotrófico (BDNF), el nivel de dopamina en las SNc en todas las condiciones experimentales tuvo una reducción significativa del 70% comparado con sus contrapartes intactas, tres semanas posteriores a la lesión en el estriado ipsilateral (Figura 9A).

De manera similar, la dopamina estriatal disminuyó en aproximadamente 70% respecto a los estriados contralaterales intactos tres semanas posteriores a la transfección con GFP, la transfección falsa con DMEM o la falta de transfección (NT), según lo muestra la figura 9B. En contraste, el nivel de dopamina encontrado en los estriados de animales hemiparkinsonianos transfectados con BDNF-flag se recuperó en 75% respecto al nivel de dopamina de estriados control (Figura 9B).

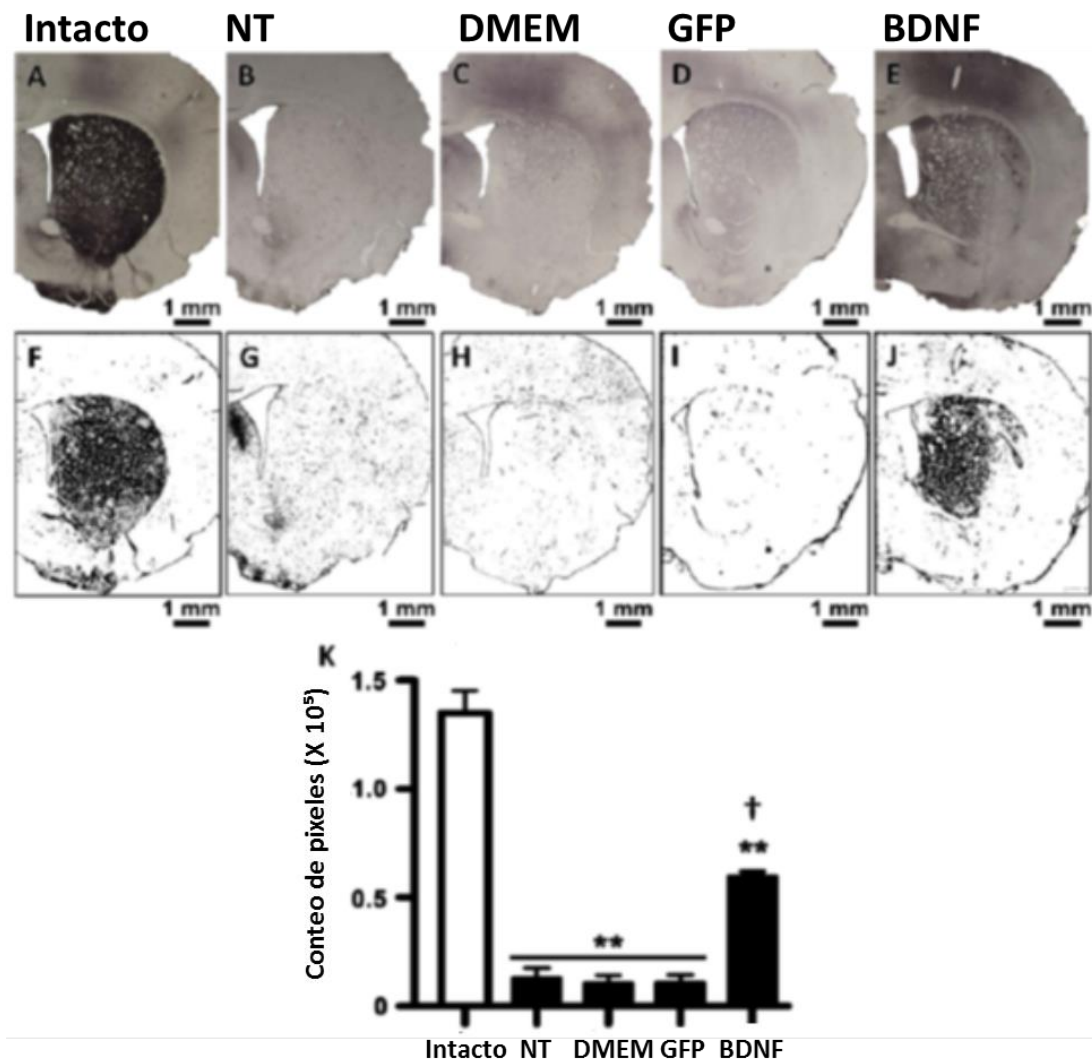


Figura 8. Diferencias morfológicas en el núcleo estriado. Cortes representativo de este núcleo procesados con inmunohistoquímica contra Tirosina Hidroxilasa (TH) en las siguientes condiciones: A) Estriado Intacto, B) Estriado Lesionado No Transfectado, C) Estriado Lesionado con falsa transfección con DMEM, D) Estriado Lesionado y transfectado con GFP, E) Estriado Lesionado y transfectado con BDNF-flag. Las imágenes inferiores (F-J) muestran la densidad de pixeles análoga a la inmunorreactividad de TH en las micrografías originales procesadas con el programa imageJ. En la gráfica K, se muestra el análisis estadístico (ANOVA y prueba *post hoc* de Bonferroni) realizado al número de pixeles en los estriados en las condiciones experimentales. Los resultados están expresados en media + error estándar de tres animales por condición, ** $P < 0.001$ comparado con el lado intacto, † $P < 0.001$ comparado con los controles negativos.

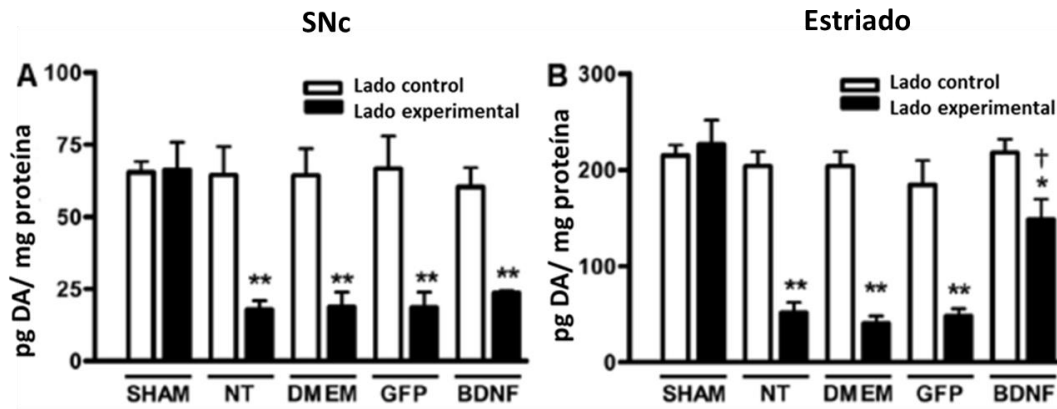


Figura 9. Los niveles de dopamina en medidos por HPLC en animales hemiparkinsonianos, dos semanas posteriores a las siguientes condiciones: SHAM (lesión falsa), NT (lesionado sin transfección), DMEM (Lesionado y falsamente), GFP (Lesionado y transfectado con gen reportero), BDNF (Lesionado y transfectado con gen neurotrófico. La gráfica A los niveles de dopamina en la SNC en las condiciones experimentales antes mencionadas; la gráfica B ilustra los niveles de dopamina encontrados en el estriado de los diferentes tratamientos. Los resultados están expresados como la media + error estándar, incluyéndose en la medición 3 animales por grupo. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ comparado con el núcleo sin lesión (SHAM), † $P < 0.05$, comparado con la condición de no transfección (NT).

6.4. Recuperación Conductual

6.4.1. Conducta Motora Espontánea en Campo Abierto

Paralelo a la recuperación morfológica y neuroquímica, también se registró mejoría en la conducta motora espontánea evaluada en campo abierto. Dos semanas posteriores a la transfección con BDNF-flag, los animales hemiparkinsonianos incrementaron significativamente la distancia total recorrida en los 30 minutos de evaluación comparado con los grupos: no transfectado (NT), transfección falsa (DMEM) y transfectado con el gen reportero (GFP), sin embargo no se observaron diferencias respecto al grupo control (Figura 10).

El grupo de animales tratados con BDNF-flag mostró valores significativamente más altos comparados con los otros grupos experimentales (NT, DMEM, GFP) en el tiempo en movimiento ambulatorio, teniendo valores comparables con los animales del grupo control. De manera complementaria los animales transfectados con BDNF-flag exhibieron menor tiempo en descanso, en comparación con los animales de los grupos NT y DMEM; no se observaron diferencias significativas respecto al tiempo de permanencia en descanso de los animales control y GFP (Figura 10).

Otro parámetro evaluado fue el movimiento estereotipado, definido como el tiempo que los animales realizan movimientos cortos y repetitivos como el

rascado, acicalado o movimientos rápidos de la cabeza. En este sentido, los animales transfectados con BDNF-flag mostraron tiempo en estereotipia similar al grupo control. En tanto, los animales del grupo no transfectado (NT) y con transfección falsa (DMEM) mostraron una reducción significativa del movimiento estereotípico respecto al grupo control (Figura 10).

En resumen, los animales tratados con BDNF-flag no mostraron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los parámetros motores evaluados en la prueba de motricidad espontánea en campo abierto respecto al grupo de lesión falsa (SHAM), lo cual sugiere una recuperación de la motricidad espontánea en ausencia de fármacos asociada a la transfección nigral con BDNF-flag.

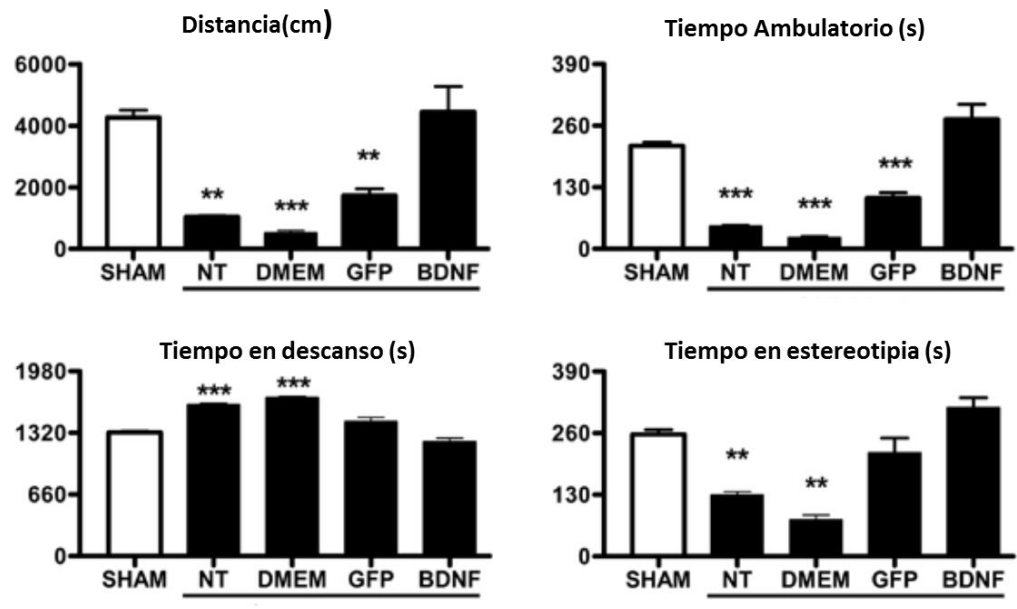


Figura 10. Conducta motora espontánea en campo abierto en animales hemiparkinsonianos de 2 semanas de evolución posterior a las siguientes condiciones de transfección: lesión falsa (SHAM), No transfectado (NT), transfección falsa (DMEM), transfectados con phDAT-EGFP-N1 (GFP) transfectados con phDAT-BDNF-flag (BDNF). Los valores expresados corresponden a la media y error estándar de 8 animales por grupo. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ comparados con el grupo SHAM. La significancias estadísticas corresponde al resultado de la prueba de ANOVA y post hoc de Bonferroni.

6.4.2. Conducta de giro inducido por Anfetamina

La evaluación del giro inducida por anfetamina permite determinar conductualmente los cambios en el balance entre los sistemas dopaminérgicos de ambos hemisferios; de modo que si existe giro en un solo sentido, esto será un indicador de que el sistema dopaminérgico ipsilateral al sentido del giro tendrá un menor nivel de dopamina que el sistema dopaminérgico contralateral.

En este experimento, el giro inducido por anfetamina fue evaluado 8 días posteriores a la lesión, funcionando como criterio de selección para la transfección nigral, y dos semanas después del tratamiento con phDAT-BDNF-flag, con phDAT-EGFP-N1 (GFP), la transfección falsa con DMEM o la progresión natural de la lesión en ausencia de transfección nigral (NT).

Para fines estadísticos, se comparó el número de giros hechos por cada animal previo y posterior a cada tratamiento de transfección nigral. Los resultados obtenidos muestran que, únicamente los animales que recibieron la transfección con el gen neurotrófico BDNF-flag tuvieron una reducción significativa de 75% en el número de giros inducidos por anfetamina respecto al número de giros en la condición previa a la transfección, comparados con las otras condiciones experimentales (NT, DMEM, GFP) que no redujeron en número de giros inducidos por el fármaco (Figura11).

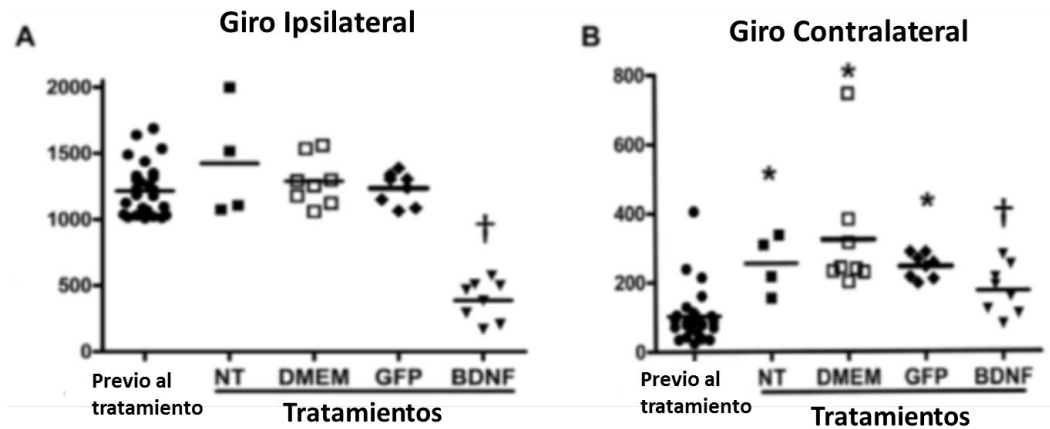


Figura 11. Conducta de giro inducida por fármacos dos semanas posteriores a la transfección utilizando el poliplex de neurotensina en las siguientes condiciones: no transfectado (NT), medio del poliplex (DMEM), gen reportero phDAT-EGFP-N1 (GFP) y gen neurotrófico phDAT-BDNF-flag (BDNF). A) Giro ipsilateral inducido por Anfetamina (8 mg/kg, i.p.) comparación de las condiciones experimentales contra el número de giros previos a la transfección, es decir 1 semana posterior a la lesión. B) Giro contralateral inducido por apomorfina (0.5mg/kg, s.c.). Los valores están expresados como la media \pm desviación estándar (DE); $n = 8$ por grupo. * $P < 0.05$ comparado con los valores de giro una semana posterior a la lesión estriatal con 6OHDA; † $P < 0.05$ comparando individualmente con los otros grupos 2 semanas posteriores a la transfección, prueba Kruskal –Wallis seguida de prueba *post hoc* de Dunn.

6.4.3. Conducta de Giro inducido por Apomorfina

La inducción de conducta de giro mediante la administración del agonista no selectivo apomorfina, permite evaluar el desarrollo de hipersensibilidad en los receptores dopaminérgicos en el estriado desnervado como consecuencia de la depleción de la dopamina endógena.

Este experimento, se realizó 24 horas después del experimento de giro inducido con Anfetamina, a los 9 días posteriores a la lesión estriatal con 6-OHDA y 2 semanas (+2 días) posteriores a la transfección intranigral con los plásmidos phDAT-EGFP-N1 (GFP), phDAT- BDNF-flag (BDNF), la falsa transfección aplicando sólo el medio del NT-PLX (DMEM) o la evolución de la lesión estriatal en ausencia de transfección (NT) (Figura 11).

En estas condiciones experimentales, el número de giros promedio inducido por apomorfina en una semana después de la lesión con 6-OHDA en los animales hemiparkinsonianos fue de 85 ± 25 giros contralateral en 90 min. Mientras que dos semanas después de la transfección intranigral, los animales hemiparkinsonianos de todos los grupos experimentales (NT, DMEM, GFP y BDNF-flag) incrementaron en al menos 50% el número de giros inducidos por apomorfina como se muestra en la Figura 11.

7. DISCUSIÓN

Este trabajo muestra por primera vez la posibilidad de utilizar una estrategia no viral para el envío dirigido del transgen BDNF a la sustancia negra después de un daño significativo con 6-OHDA manifestado a través de alteraciones motoras, bioquímicas y morfológicas evidentes.

Un hallazgo importante de nuestro trabajo fue el hecho que las neuronas dopaminérgicas nigrales aún en condiciones posteriores a la lesión conservan la expresión del receptor de alta afinidad para neurotensina (NTSR1), situación similar a lo que ocurre en las etapas avanzadas de la enfermedad de Parkinson (Uhl GR, 1984) y constituye un requisito indispensable para el envío dirigido de genes mediante el NT- PLX. La presencia de NTSR1 hizo posible la transfección de las neuronas dopaminérgicas sobrevivientes a lesión inducida por la administración intraestriatal de 6OHDA. La expresión del plásmido phDAT-BDNF-flag se relacionó con una robusta ramificación de fibras dopaminérgicas en la SNc ipsilateral al sitio de lesión, así como el aparente restablecimiento de las fibras TH+ en el núcleo estriado previamente “desnervado”, contrario a lo ocurrido en las otras condiciones experimentales (NT, DMEM y GFP). Pese al incremento significativo de los niveles de DA en el núcleo estriado ipsilateral a la lesión en el periodo temprano de 2 semanas posteriores a la transfección, no se observó aumento en el nivel de DA nigral, por lo que cabría la posibilidad de explorar el transporte diferencial del neurotransmisor a partir de la SNc transfectada a sus sitios blanco.

Por otra parte, la recuperación morfológica parcial de la innervación DA estriatal asociada a la expresión nigral de la proteína transgénica BDNF-flag se relaciona asimismo con la reversión de la asimetría de los sistemas nigroestriatales en las ratas hemiparkinsonianas, manifestado por el decremento del 70% en el número de giros inducidos por anfetamina. De igual manera, la expresión de BDNF-flag indujo la recuperación de las alteraciones motoras espontáneas en los animales con hemiparkinsonismo.

La recuperación morfológica y funcional del hemiparkinsonismo agudo en la rata es indicador de que las neuronas DA conservaron su capacidad de responder a BDNF y sugiere la presencia del receptor TrkB en estas neuronas.

Basándonos en la evidencia de la expresión del mRNA y de la proteína TrkB en la SNc de pacientes hemiparkinsonianos, nuestros hallazgos apuntan a la posibilidad de una exitosa terapia génica con BDNF, utilizando el NT-PLX en las etapas tempranas de la EP.

Aunque algunos resultados en humanos podrían estimarse con base en los experimentos hechos en primates como monos *rhesus*, en donde se ha transfectado AAV2-neurturina en el caudado-putamen íntegro; encontrando altos índices de inmunorreactividad contra TH e hipertrofia nigral, un año después de la transfección (Herzog CD, 2009). Estos resultados requieren de un abordaje clínico, a fin de evaluar los beneficios potenciales en pacientes. De este modo, la terapia génica para EP ha tenido algunos abordajes clínicos donde han explorado la factibilidad de la terapia génica para la EP, utilizando un vector adenoasociado tipo 2 (AAV2) para transfectar el gen de la neurturina, proteína perteneciente también a la familia de las neurotrofinas, en ambos putámenes de pacientes con EP en etapa avanzada (Bartus RT, 2011). La valoración de los pacientes transfectados con AAV2-neurturina evaluados 18 meses posteriores a la cirugía mostraron efectos benéficos motores modestos, pero significativos comparados con los individuos con cirugía placebo. Sin embargo, estudios recientes de envío del gen de neurturina hechos en pacientes que participaron en ensayos clínicos fallecidos poco (1-3 meses) o mucho (4 años) tiempo posterior a la intervención, han reportado que la expresión de neurturina permanece en ambos casos, pero que la inmunorreactividad contra TH era escasa en los pacientes de corto tiempo de transfección, mientras que la misma era 6 veces mayor en los pacientes de larga evolución. A pesar de conservar la expresión del transgen de neurturina en el estriado, las neuronas dopaminérgicas que lo expresaron fueron apenas el 1% para los pacientes de corta progresión y el 5% para aquellos de 4 años posteriores a la transfección (Bartus RT, 2015).

Con base en la experiencia preclínica y clínica obtenida con la transfección de AAV2-neurturina, en este trabajo consideramos que es factible la utilización de BDNF-flag en etapas avanzadas de la EP, teniendo como requisito cierta proporción mínima de fibras y neuronas dopaminérgicas en el sistema nigro-estriatal. Asimismo, se sugiere que la aplicación de la estrategia génica con factores tróficos sea en el mesencéfalo, de modo que se evite una

transfección fallida a consecuencia de la baja o nula densidad de fibras dopaminérgicas para el transporte retrógrado.

A partir de las evidencias experimentales de este trabajo, proponemos que el NTS-poliplex es un vector con potencial para la transfección de phDAT-BDNF-flag a las neuronas DA de pacientes en etapas de tempranas a intermedias de la EP. Una clara ventaja de la utilización del NTS-PLX reside en el hecho de que este sería únicamente internalizado por las neuronas DA que selectivamente expresen TrkB, en contraposición a los vector virales que son capturados por todas las estirpes celulares circundantes al sitio de inyección (Bartus RT, 2011). Además, basándonos en la evidencia probada de que el NTS-poliplex es capaz de co-transfectar dos genes reporteros *in vitro*, es posible que esta eficiencia pudiera resaltarse si se usa para el envío simultáneo de dos o más genes de distintas moléculas neurotróficas. Otra alternativa, pudiera ser la co-transfección de un único factor trófico y su receptor para potenciar el efecto trófico.

A pesar de que los estudios preclínicos han permitido vislumbrar los beneficios potenciales del uso de la terapia génica para el restablecimiento de la inervación DA en la EP, existe también evidencia de las limitaciones que este procedimiento presenta. Por ejemplo, aquellos protocolos donde se expresó GDNF se han asociado a efectos colaterales indeseables como resultado de la inervación aberrante de las fibras DA en regeneración, así como el decremento en la síntesis de DA. Otros estudios han documentado el funcionamiento por debajo del nivel fisiológico de la DA estriatal después de la administración intranigral crónica de BDNF. Estos asuntos concernientes a la seguridad hacen énfasis en la necesidad de más investigación orientada a identificar los mejores vectores y genes que provean los máximos beneficios con los mínimos efectos adversos. Por ejemplo, la regulación de la expresión genética debe ser implementada en los vectores génicos de modo que sea posible apagar la expresión génica en caso de que se desarrollen efectos nocivos inesperados.

En suma, los resultados de nuestro trabajo aunado al éxito de los estudios preclínicos con otros genes codificantes de factores tróficos, apoyan fuertemente la viabilidad en el uso del NTS-PLX en terapia génica para una selectiva y eficaz recuperación de la inervación DA estriatal en las etapas tempranas de la EP.

8. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran que la terapia neurotrófica con BDNF-flag utilizando el NT- PLX es posible para la población dopaminérgica nigral aún en condiciones posteriores a la lesión aguda con el neurotóxico 6-OHDA, ya que estas conservan el receptor de alta afinidad para neurotensina NTSR1. Asimismo, los resultados aquí descritos demuestran que la expresión de la proteína transgénica BDNF-flag indujo recuperación morfológica, neuroquímica y conductual en un modelo de hemiparkinsonismo con daño agudo y severo. El efecto más notorio de nuestro estudio fue la inducción a la ramificación de los procesos dendríticos nigrales asociados a la recuperación parcial del nivel de dopamina en el núcleo estriado.

Otro hallazgo importante resulta la posibilidad de restablecer en un alto porcentaje (70%) el nivel de dopamina en el principal núcleo de inervación, así como la reducción de los síntomas motores espontáneos e inducidos con fármacos; esto, considerando que no se observaron diferencias en el número de neuronas existentes en la SNc en condiciones de lesión o de transfección. Este último punto, resulta importante si tomamos en cuenta que la sintomatología de la EP humana se evidencia sólo al momento en que la pérdida de la población dopaminérgica nigral excede el 80% de la población celular. Finalmente sugerimos que con miras a la utilización de esta estrategia de envío de genes con fines terapéuticos, se exploren un abordaje menos invasivos. También, es importante establecer un sistema de regulación de la expresión del transgen, así como explorar la posibilidad de efectos colaterales como la arborización aberrante como resultado de la expresión sostenida de proteínas transgénicas como BDNF-flag.

REFERENCIAS

Alarcón Aguilar A, Santamaría del Ángel A, Königsberg Fainstein M. (2010). Modelos neurotóxicos de la enfermedad de Parkinson y disfunción mitocondrial. *Revista de Educación Bioquímica*, vol 29, núm 3, pp. 92-100. Universidad Nacional Autónoma de México.

Altar, CA, Boylan, CB, Fritsche, M, Jones, BE, Jackson, C, Wiegand, SJ et al. (1994). Efficacy of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on neurochemical and behavioral deficits associated with partial nigrostriatal dopamine lesions. *J Neurochem* 63: 1021-1032.

Alonso-Vanegas MA, Fawcett JP, Causing CG, Miller FD, Sadikot AF. (1999). Characterization of dopaminergic midbrain neurons in a DBH: BDNF transgenic mouse. *J Comp Neurol* 413(3):449-62.

Antonelli T. (2007). Receptor-receptor interactions as studied with microdialysis. Focus on NTR/D2 interactions in the basal ganglia. *J Neural Transm* (Vienna).

Arango-Rodriguez, ML, Navarro-Quiroga, I, Gonzalez-Barrios, JA, Martinez-Arguelles, DB, Bannon, MJ, Kouri, J et al. (2006). Biophysical characteristics of neurotensin polyplex for in vitro and in vivo gene transfection. *Biochim Biophys Acta* 1760: 1009-1020.

Baker SA, Stanford LE, Brown RE, and Hagg, T. (2005). Maturation but not survival of dopaminergic nigrostriatal neurons is affected in developing and aging BDNF-deficient mice. *Brain Res* 1039: 177-188.

Barde YA, Edgar D, Thoenen H. (1982). Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J*; 1(5):549-53.

Bartels AL, Leenders KL. (2009). Parkinson's disease: the syndrome, the pathogenesis and pathophysiology. *Cortex*; 45(8):915-21.

Bartus RT, Brown L, Wilson A, Kruegel B, Siffert J, Johnson EM Jr, Kordower JH, Herzog CD. (2011) Properly scaled and targeted AAV2-NRTN (neurturin) to the substantia nigra is safe, effective and causes no weight loss: support for nigral targeting in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*; 44(1):38-52.

Bartus RT, Kordower JH, Johnson EM Jr, Brown L, Kruegel BR, Chu Y, Baumann TL, Lang AE, Olanow CW, Herzog CD (2015). Post-mortem assessment of the short and long-term effects of the trophic factor neurturin in patients with α -synucleinopathies. *Neurobiol Dis*; 78:162-71.

Batchelor PE, Porritt MJ, Martinello P, Parish CL, Liberatore GT, Donnan GA, Howells DW. (2002). Macrophages and Microglia Produce Local Trophic Gradients That Stimulate Axonal Sprouting Toward but Not beyond the Wound Edge. *Mol Cell Neurosci*; 21(3):436-53.

Baquet, ZC, Bickford, PC, and Jones, KR (2005). Brain-derived neurotrophic factor is required for the establishment of the proper number of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. *J Neurosci* 25: 6251-6259.

Beal MF (1995). Metabolic disorders and neurotoxicology. *Curr Opin Neurol*. 1995;8(6):467-8

Beaudet A, Woulfe J (1992). Morphological substrate for neurotensin-dopamine interactions in the rat midbrain tegmentum. *Ann N Y Acad Sci*; 668:173-85.

Benisty S, Boissiere F, Faucheux B, Agid Y, and Hirsch, EC. (1998). trkB messenger RNA expression in normal human brain and in the substantia nigra of parkinsonian patients: an in situ hybridization study. *Neuroscience* 86: 813-826.

Bennet MR, Gibson WG, Lemon G. (2002). Neuronal cell death, nerve growth factor and neurotrophic models: 50 years on. *Auton Neurosci*. 10; 95(1-2):1-23.

- Binder DK. (2007). Neurotrophins in the dentate gyrus. *Prog Brain Res*; 163:371-97.
- Biskup S, Moore DJ. (2006). Detrimental deletions: mitochondria, aging and Parkinson's disease. *Bioessays*; 28(10):963-7
- Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S. (2012). Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J Biomed Biotechnol*; 845618.
- Bové J, Perier C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience* 1; 211:51-76.
- Brighina L, Frigerio R, Schneider NK, Lesnick TG, de Andrade M, Cunningham JM, Farrer MJ, Lincoln SJ, Checkoway H, Rocca WA, Maraganore DM. (2008). Alpha-synuclein, pesticides, and Parkinson disease: a case-control study. *Neurology* 15; 70(16 Pt 2):1461-9.
- Brown TP. (2006). Pesticides and Parkinson's disease--is there a link? Review Article. *Environ Health Perspect*.
- Canudas AM, Pezzi S, Canals JM, Pallàs M, Alberch J. (2005). Endogenous brain-derived neurotrophic factor protects dopaminergic nigral neurons against transneuronal degeneration induced by striatal excitotoxic injury. *Brain Res Mol Brain Res*; 134(1):147-54.
- Castel MN, Woulfe J, Wang X, Laduron PM, Beaudet A. (1992). Light and electron microscopic localization of retrogradely transported neurotensin in rat nigrostriatal dopaminergic neurons. *Neuroscience*; 50(2):269-82.
- Chan CS, Guzman JN, Ilijic E, Mercer JN, Rick C, Tkatch T, Meredith GE, Surmeier DJ. (2007). 'Rejuvenation' protects neurons in mouse models of Parkinson's disease. *Nature* 28; 447(7148):1081-6.
- Chan CS, Gertler TS, Surmeier DJ. (2009). Calcium homeostasis, selective vulnerability and Parkinson's disease. *Trends Neurosci*; 32(5):249-56.
- Chen L, Xie Z, Turkson S, Zhuang X. (2015). A53T human α -synuclein overexpression in transgenic mice induces pervasive mitochondria

macroautophagy defects preceding dopamine neuron degeneration. *J Neurosci*; 35(3):890-905.

Cruz Alcalá LE, Vázquez Castellanos JL. (2002). Prevalencia de algunas enfermedades neurológicas en la ciudad de Tepalitlán, Jalisco, México. *Rev. Mex. Neurocienci*: 3(2) 71-76.

Cunha C, Brambilla R, Thomas KL. (2010). A simple role for BDNF in learning and memory? *Front Mol Neurosci*; 3:1.

Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ. (1979). Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res*; 1(3):249-54.

Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A, Tanner CM. (2007) Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 30; 68(5):384-6.

Dranka BP, Gifford A, McAllister D, Zielonka J, Joseph J, O'Hara CL, Stucky CL, Kanthasamy AG, Kalyanaraman B. (2014). A novel mitochondrially-targeted apocynin derivative prevents hyposmia and loss of motor function in the leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2(R1441G)) transgenic mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 7;583:159-64.

Emre M. (2003). Dementia associated with Parkinson's disease. *Lancet Neurol*; 2(4):229-37.

Eslamboli A, Georgievska B, Ridley RM, Baker HF, Muzyczka N, Burger C, Mandel RJ, Annett L, Kirik D. (2005). Continuous low-level glial cell line-derived neurotrophic factor delivery using recombinant adeno-associated viral vectors provides neuroprotection and induces behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease. *J Neurosci*; 25(4):769-77.

Faggin BM, Zubieta JK, Rezvani AH, Cubeddu LX. (1990). Neurotensin-induced dopamine release in vivo and in vitro from substantia nigra and nucleus caudate. *J Pharmacol Exp Ther*; 252(2):817-25.

Fuxe K, Von Euler G, Agnati LF, Merlo Pich E, O'Connor WT, Tanganelli S, Li XM, Tinner B, Cintra A, Carani C, et al. (1992). Intramembrane interactions between neurotensin receptors and dopamine D2 receptors as a major mechanism for the neuroleptic-like action of neurotensin. *Ann N Y Acad Sci.* 668:186-204.

Gavériaux-Ruff C, Kieffer BL.(2007). Conditional gene targeting in the mouse nervous system: Insights into brain function and diseases. *Pharmacol Ther*;113(3):619-34.Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME. (1994). Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science*.18; 263(5153):1618-23.

Giasson BI, Lee VM. (2003). Are ubiquitination pathways central to Parkinson's disease? *Cell* 11; 114(1):1-8.

Góngora Alfaro JL, Moo Puc RE, Villanueva Toledo J, Arankowsky Sandoval GM, Álvarez Cervera FJ, Pineda Cortés JC, Heredia López FJ, Bata García JL. (2005) La cafeína y los antagonistas de los receptores A2A como posibles adyuvantes de la terapia anticolinérgica en la enfermedad de Parkinson. *Rev Biomed* 16:99-111.

Gonzalez-Barrios, JA, Lindahl, M, Bannon, MJ, Anaya-Martinez, V, Flores, G, Navarro-Quiroga, I et al. (2006). Neurotensin polyplex as an efficient carrier for delivering the human GDNF gene into nigral dopamine neurons of hemiparkinsonian rats. *Mol Ther* 14: 857-865.

Gruden MA, Sewell RD, Yanamandra K, Davidova TV, Kucheryanu VG, Bocharov EV, Bocharova OA, Polyschuk VV, Sherstnev VV, Morozova-Roche LA. (2011). Immunoprotection against toxic biomarkers is retained during Parkinson's disease progression. *J Neuroimmunol*; 233(1-2):221-7.

Hagg T. (1998). Neurotrophins prevent death and differentially affect tyrosine hydroxylase of adult rat nigrostriatal neurons in vivo. *Exp Neurol*; 149(1):183-92.

Herzog CD, Brown L, Gammon D, Kruegel B, Lin R, Wilson A, Bolton A, Printz M, Gasmi M, Bishop KM, Kordower JH, Bartus RT.(2009). Expression, bioactivity, and safety 1 year after adeno-associated viral vector

type 2-mediated delivery of neurturin to the monkey nigrostriatal system support cere-120 for Parkinson's disease. *Neurosurgery*; 64(4):602-12.

Howells DW, Porritt MJ, Wong, JY, Batchelor, PE, Kalnins, R, Hughes, AJ et al. (2000). Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Exp Neurol*;166: 127-135.

Huang EJ, Reichardt LF. (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci*; 24:677-736.

Huang R, Ke W, Han L, Liu Y, Shao K, Jiang C et al. (2010). Lactoferrin-modified nanoparticles could mediate efficient gene delivery to the brain in vivo. *Brain Res Bull*; 81: 600-604.

Hudson JL, Van Horne CG, Stromberg I, Brock S, Clayton J, Masserano J et al. (1993). Correlation of apomorphine- and amphetamine-induced turning with nigrostriatal dopamine content in unilateral 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Brain Res* 626: 167-174.

Hyman C, Hofer, M, Barde, YA, Juhasz, M, Yancopoulos, GD, Squinto, SP et al. (1991). BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature*; 350: 230-232.

Jenner P. (1998). Oxidative mechanisms in nigral cell death in Parkinson's disease. *Mov Disord*; 13 Suppl 1:24-34

Jenner P. (2003). Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*; 53 Suppl 3:S26-36; discussion S36-8.

Johnson JE, Barde YA, Schwab M, Thoenen H. (1986). Brain-derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat retinal ganglion cells. *J Neurosci*; 6(10):3031-8.

Jomphe C, Lemelin PL, Okano H, Kobayashi K, Trudeau LE.(2006). Bidirectional regulation of dopamine D2 and neurotensin NTS1 receptors in dopamine neurons. *Eur J Neurosci*; 24(10):2789-800. 20.

Kell DB. (2010). Towards a unifying, systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron:

Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples. *Arch Toxicol*; 84(11):825-89.

Klein, RL, Lewis, MH, Muzyczka N, and Meyer EM. (1999). Prevention of 6-hydroxydopamine-induced rotational behavior by BDNF somatic gene transfer. *Brain Res*; 847: 314-320.

Knüsel B, Winslow JW, Rosenthal A, Burton LE, Seid DP, Nikolics K, Hefti F. (1991). Promotion of central cholinergic and dopaminergic neuron differentiation by brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin 3. *Proc Natl Acad Sci*; 88(3):961-5.

Kos CH. (2004). Cre/loxP system for generating tissue-specific knockout mouse models. *Nutr Rev*; 62(6 Pt 1):243-6. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis *Science*; 219(4587):979-80.

Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science*; 219(4587):979-80.

Levivier, M, Przedborski, S, Bencsics, C, and Kang, UJ. (1995). Intrastriatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci*; 15: 7810-7820.

Liu G, Aliaga L, Cai H. (2012). α -synuclein, LRRK2 and their interplay in Parkinson's disease. *Future Neurol*. 2012; 7(2):145-153.

Long-Smith CM, Sullivan AM, Nolan YM. (2009). The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*; 89(3):277-87.

Lotharius J, Brundin P. (2002) Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci*; 3(12):932-42.

Lowenstein DH, Arsenault L. (1996). The effects of growth factors on the survival and differentiation of cultured dentate gyrus neurons. *J Neurosci*; 16(5):1759-69.

Lu XH, Fleming SM, Meurers B, Ackerson LC, Mortazavi F, Lo V, Hernandez D, Sulzer D, Jackson GR, Maidment NT, Chesselet MF, Yang XW. (2009). Bacterial artificial chromosome transgenic mice expressing a truncated mutant parkin exhibit age-dependent hypokinetic motor deficits, dopaminergic neuron degeneration, and accumulation of proteinase K-resistant alpha-synuclein. *J Neurosci*; 29(7):1962-76.

Mercuri NB, Calabresi P, Bernardi G. (1992). The electrophysiological actions of dopamine and dopaminergic drugs on neurons of the substantia nigra pars compacta and ventral tegmental area. *Life Sci*; 51(10):711-8.

Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. (2001). Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*; 276(16):12660-6.

Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. (2001). Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*; 63(1):71-124.

Napolitano A, Manini P, d'Ischia M. (2011). Oxidation chemistry of catecholamines and neuronal degeneration: an update. *Curr Med Chem*; 18(12):1832-45.

Navarro-Quiroga, I, Gonzalez-Barrios, JA, Barron-Moreno, F, Gonzalez-Bernal, V, Martinez-Arguelles, DB, and Martinez-Fong, D (2002). Improved neurotensin-vector-mediated gene transfer by the coupling of hemagglutinin HA2 fusogenic peptide and Vp1 SV40 nuclear localization signal. *Brain Res Mol Brain Res* 105: 86-97.

Nemeroff CB, Bissette G, Manberg PJ, Osbahr AJ 3rd, Breese GR, Prange AJ Jr. (1988). Neurotensin-induced hypothermia: evidence for an interaction with dopaminergic systems and the hypothalamic--pituitary--thyroid axis. *Brain Res*; 195(1):69-84.

Numan, S, Seroogy, KB. (1999). Expression of trkB and trkC mRNAs by adult midbrain dopamine neurons: a double-label in situ hybridization study. *J Comp Neurol*; 403: 295-308.

Numan S, Gall CM, Seroogy KB. (2005). Developmental expression of neurotrophins and their receptors in postnatal rat ventral midbrain. *J Mol Neurosci*; 27(2):245-60.

Oades RD, Halliday GM. (1987). Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Res*. 434(2):117-65.

Oo TF, Marchionini DM, Yarygina O, O'Leary PD, Hughes RA, Kholodilov N, Burke RE. (2009). Brain-derived neurotrophic factor regulates early postnatal developmental cell death of dopamine neurons of the substantia nigra in vivo. *Mol Cell Neurosci*; 41(4):440-7.

Ostergaard K, Jones SA, Hyman C, Zimmer J. (1996). Effects of donor age and brain-derived neurotrophic factor on the survival of dopaminergic neurons and axonal growth in postnatal rat nigrostriatal cocultures. *Exp Neurol*. 1996; 142(2):340-50.

Parain K, Murer MG, Yan Q, Faucheux B, Agid Y, Hirsch E, Raisman-Vozari R. (1999). Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson's disease substantia nigra. *Neuroreport*; 10(3):557-61.

Paxinos G, Watson C. (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier.

Phani S, Loike JD, Przedborski S. (2012). Neurodegeneration and inflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*; 18 Suppl 1:S207-9.

Porritt MJ, Batchelor PE, Howells DW. (2005). Inhibiting BDNF expression by antisense oligonucleotide infusion causes loss of nigral dopaminergic neurons. *Exp Neurol*; 192(1):226-34.

Reichmann H, Schneider C, Löhle M. (2009) Non-motor features of Parkinson's disease: depression and dementia. *Parkinsonism Relat Disord*; 15 Suppl 3:S87-92.

Rite I, Machado A, Cano J, Venero JL. (2005). Divergent regulatory mechanisms governing BDNF mRNA expression in cerebral cortex and substantia nigra in response to striatal target ablation. *Exp Neurol*; 192(1):142-55.

Rubio-Zapata HA, Rembao-Bojorquez JD, Arango-Rodriguez ML, Dupouy S, Forgez P, Martinez-Fong D. (2009). NT-polyplex: a new tool for therapeutic gene delivery to neuroblastoma tumors. *Cancer Gene Ther*. 16(7):573-84.

Sadoul, JL, Checler F, Kitabgi P, Rostene W, Javoy-Agid F, and Vincent JP (1984). Loss of high affinity neurotensin receptors in substantia nigra from parkinsonian subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 125: 395-404.

Sauer H, Fischer W, Nikkhah G, Wiegand SJ, Brundin P, Lindsay RM, Björklund A. (1993). Brain-derived neurotrophic factor enhances function rather than survival of intrastriatal dopamine cell-rich grafts. *Brain Res*; 626(1-2):37-44.

Schapira AH. (2008) Progress in neuroprotection in Parkinson's disease *Eur J Neurol*; 15 Suppl 1:5-13.

Schwartz RK, Huston JP. (1996). The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. *Prog Neurobiol*; 50(2-3):275-331.

Seroogy KB, Lundgren KH, Tran TM, Guthrie KM, Isackson PJ, and Gall CM (1994). Dopaminergic neurons in rat ventral midbrain express brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs. *J Comp Neurol* 342: 321-334.

Sgobio C, Kupferschmidt DA, Cui G, Sun L, Li Z, Cai H, Lovinger DM. (2014). Optogenetic measurement of presynaptic calcium transients using conditional genetically encoded calcium indicator expression in dopaminergic neurons. *PLoS One*; 9(10).

Somoza R, Juri C, Baes M, Wyneken U, Rubio FJ. (2010). Intranigral transplantation of epigenetically induced BDNF-secreting human mesenchymal stem cells: implications for cell-based therapies in Parkinson's disease. *Biol Blood Marrow Transplant*; 16(11):1530-40.

Spina, MB, Hyman, C, Squinto, S, and Lindsay, RM (1992). Brain-derived neurotrophic factor protects dopaminergic cells from 6-hydroxydopamine toxicity. *Ann N Y Acad Sci* 648: 348-350.

Stahl K, Mylonakou MN, Skare Ø, Amiry-Moghaddam M, Torp R. (2011). Cytoprotective effects of growth factors: BDNF more potent than GDNF in an organotypic culture model of Parkinson's disease. *Brain Res*; 1378:105-18.

St-Gelais F, Legault M, Bourque MJ, Rompré PP, Trudeau LE. (2004). Role of calcium in neurotensin-evoked enhancement in firing in mesencephalic dopamine neurons. *J Neurosci* 10; 24(10):2566-74.

Sun M, Kong L, Wang X, Lu XG, Gao Q, and Geller AI. (2005). Comparison of the capability of GDNF, BDNF, or both, to protect nigrostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1052: 119-129

Surmeier DJ. (2007). Calcium, ageing, and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Lancet Neurol*; 6(10):933-8.

Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Schumacker PT. (2011). The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Neuroscience* 15; 198:221-31.

Tagliaferro P, Kareva T, Oo TF, Yarygina O, Kholodilov N, Burke RE. (2015). An early axonopathy in a hLRRK2(R1441G) transgenic model of Parkinson disease. *Neurobiol Dis*;82:359-71.

Ungerstedt U. (1968). 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol*; 5(1):107-10.

Uhl GR, Whitehouse PJ, Price DL, Tourtelotte WW, Kuhar MJ. (1984). Parkinson's disease: depletion of substantia nigra neurotensin receptors. *Brain Res*;308(1):186-90.

Vankova M, Arluison M, Leviel V, Tramu G. (1992). Afferent connections of the rat substantia nigra pars lateralis with special reference to peptide-containing neurons of the amygdalo-nigral pathway. *J Chem Neuroanat*; 5(1):39-50.

Venero JL, Vizuete ML, Revuelta M, Vargas C, Cano J, Machado A.(2000). Upregulation of BDNF mRNA and trkB mRNA in the nigrostriatal system and in the lesion site following unilateral transection of the medial forebrain bundle. *Exp Neurol*; 161(1):38-48.

Ward NL, Hagg T. (2000). BDNF is needed for postnatal maturation of basal forebrain and neostriatum cholinergic neurons in vivo. *Exp Neurol*; 162(2):297-310.

Woulfe J, Beaudet A. (1989). Immunocytochemical evidence for direct connections between neurotensin-containing axons and dopaminergic neurons in the rat ventral midbrain tegmentum. *Brain Res*; 479(2):402-6.

Yang D, Peng C, Li X, Fan X, Li L, Ming M, Chen S, Le W. (2008). Pitx3-transfected astrocytes secrete brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor and protect dopamine neurons in mesencephalon cultures. *J Neurosci Res*. 86(15):3393-400.

Yoshimoto Y, Lin Q, Collier TJ, Frim DM, Breakefield XO, and Bohn MC (1995). Astrocytes retrovirally transduced with BDNF elicit behavioral improvement in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 691: 25-36.

Youdim MB, Stephenson G, Ben Shachar D. (2004). Ironing iron out in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases with iron chelators: a lesson from 6-hydroxydopamine and iron chelators, desferal and VK-28. *Ann N Y Acad Sci*; 1012:306-25.

Yurek DM, Lu W, Hipkens S, Wiegand SJ. (1996). BDNF enhances the functional reinnervation of the striatum by grafted fetal dopamine neurons. *Exp Neurol*;137(1):105-18.

Yurek DM, Fletcher-Turner A. (2000). Lesion-induced increase of BDNF is greater in the striatum of young versus old rat brain. *Exp Neurol*; 161(1):392-6.

Yurek DM, Fletcher-Turner A. (2001). Differential expression of GDNF, BDNF, and NT-3 in the aging nigrostriatal system following a neurotoxic lesion. *Brain Res*; 891(1-2):228-35.

Xu Q, Shenoy S, Li C. (2012). Mouse models for LRRK2 Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*;18 Suppl 1:S186-9.

Zamudio S, Fregoso T, Miranda A, De La Cruz F, Flores G. (2005). Strain differences of dopamine receptor levels and dopamine related behaviors in rats. *Brain Res Bull*; 65(4):339-47.

Ziebell M, Khalid U, Klein AB, Aznar S, Thomsen G, Jensen P, Knudsen GM. (2012). Striatal dopamine transporter binding correlates with serum BDNF levels in patients with striatal dopaminergic neurodegeneration. *Neurobiol Aging*; 33(2):428.

Zhou J, Pliego-Rivero B, Bradford HF, Stern GM. (1996). The BDNF content of postnatal and adult rat brain: the effects of 6-hydroxydopamine lesions in adult brain. *Brain Res Dev Brain Res*; 97(2):297-303.

Zhou J, Bradford HF, Stern GM. (1997). Influence of BDNF on the expression of the dopaminergic phenotype of tissue used for brain transplants. *Brain Res Dev Brain Res*;100(1):43-51.

TABLA DE ABREVIATURAS

- BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro
- CREB: Proteína de unión del elemento responsivo a AMPc
- DAT: Transportador de dopamina
- DE: Desviación Estándar
- EP: Enfermedad de Parkinson
- E14-16: Día embrionario 14-16
- GDNF: Factor neurotrófico derivado de la glía
- GFP: Proteína verde fluorescente
- MAPK: Cinasa activada por mitógeno
- MFB: Haz medial del cerebro anterior
- MPP+: ión 1-metil-4-fenilpiridina
- MPTP: 1-metil- 4- fenil, 1,2,5,6- tetrahidropiridina
- NGF: Factor de crecimiento neural
- NT: No transfectado
- NT's: Neurotrofinas
- NTSR1: Receptor de neurotensina de alta afinidad
- NTS: Neurotensina
- pb: pares de bases
- PBS: Solución amortiguador de fosfatos
- PF: Péptido fusogénico
- PK: Péptido cariofílico
- PLC- γ 1: Fosfolipasa C γ 1
- PLL: Poli-L lisina
- PLX- NT: Poliplex de neurotensina
- P14-15: Día postnatal 14-15
- RNAm: RNA mensajero
- ROS: Especies reactivas de oxígeno
- SEM: Error estándar de la media
- SNc: Sustancia negra pars compacta
- SPECT: Tomografía por emisión de positrón único
- TH: Tirosina hidroxilasa
- TrK: Receptor tirosina cinasa
- 6OHDA: 6- hidroxidopamina